THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

JOSEPH DIETRICH

Attaché de recherches au C. N. R. S.

PREMIÈRE THÈSE

APPLICATION DE LA MICRORADIOGRAPHIE PAR CONTACT A L'ÉTUDE DE LA DIVISION CELLULAIRE.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 29 Mars 1963 devant la Commission d'examen :

MM. MARESQUELLE *Président*

GAGNIEU, GOLDSZTAUB } *Examinateurs*

GAUTHERET *Professeur à la Faculté des Sciences de Paris*
Membre de l'Institut

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0028

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

JOSEPH DIETRICH

Attaché de recherches au C. N. R. S.

PREMIÈRE THÈSE

APPLICATION DE LA MICRORADIOGRAPHIE PAR CONTACT A L'ÉTUDE DE LA DIVISION CELLULAIRE.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 29 Mars 1963 devant la Commission d'examen :

MM. MARESQUELLE *Président*

GAGNIEU, GOLDSZTAUB } *Examinateurs*

GAUTHERET *Professeur à la Faculté des Sciences de Paris*
Membre de l'Institut

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

LISTE DES PROFESSEURS

Doyen: Professeur G. MILLOT.

Doyens honoraires: A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H. J. MARESQUELLE.

Professeurs honoraires: Ed. BAUER, P. de BEAUCHAMP, R. BONNET, L. BOUNOURE, H. CARTAN, G. CERF, Cl. CHABAUTY, A. CHRÉTIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRÉCHET, H. GAULT, L. HACKSPILL, A. HÉE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMÉE, P. L'HÉRITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NÉEL, H. OLLIVIER, G. RIBAUD, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, E. WOLFF, S. YVON.

Secrétaire: G. SAINT-PÉ.

Professeurs:

H. WEISS	T.	Physicochimie des Hydrocarbures
G. HUGEL	T.	Chimie du Pétrole
H. J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHÉ	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J. H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
L. BOISSELET	T.	Chimie analytique du Pétrole
A. MAILLARD	T.T.P.	Chimie
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.T.P.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie minérale et Chimie physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle PEREY M.	T.	Chimie nucléaire
Ph. PLUVINAGE	T.	Physique expérimentale
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physique générale
J. L. KOSZUL	T.	Topologie
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle GILLET S.	T.T.P.	Paléontologie
Mlle GAGNIEU A.	T.T.P.	Botanique
R. THOM	T.	Analyse supérieure
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	P.S.C.	Chimie biologique
J. BRENET	T.T.P.	Chimie physique
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
Fr. STEPHAN	P.S.C.	Zoologie
Cl. LEVI	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire

R. Cerf	T.T.P.	Physique
M. Berger	T.T.P.	Mathématiques
J. Frenkel	T.T.P.	Mathématiques
P. Taglang	T.	Physique
J. P. Lonchamp	P.S.C.	Physique
J. Boscher	P.S.C.	Mécanique des Fluides
A. Deluzarche	T.T.P.	Chimie
J. B. Donnet	T.T.P.	Chimie Physique
R. Armbruster	P.S.C.	Physique
A. Roche	P.S.C.	Physique du Globe
L. Hirth	T.	Microbiologie
J. Yoccoz	T.	Physique théorique
A. Sigot	P.S.C.	Zoologie
J. Cogne	P.S.C.	Géologie
A. Fuchs	T.	Mécanique rationnelle
A. Gallmann	P.S.C.	Physique
P. Miahle	T.T.P.	Physiologie animale
J. P. Ebel	T.	Chimie biologique

Maîtres de Conférences:

J. Parrod	Chimie
R. Wey	Chimie
J. Wucher	Physique
Mme D. Magnac	Physique
Mme M. Brini	Chimie
M. Daune	Physique
J. P. Adloff	Chimie nucléaire
J. Gremillard	Mathématiques
G. Perny	Physique
J. Levisalles	Chimie
D. Bernard	Méthodes Mathématiques de la Physique
R. Baro	Physique
G. Lapraz	Botanique
H. Danan	Physique
M. Zisman	Mathématiques
E. Daniel	Physique
F. Norguet	Mathématiques
P. Chevallier	Physique
J. Leray	Physique
H. Duranton	Botanique
R. Weiss	Chimie
P. Cartier	Mathématiques
J. P. Schwing	Chimie
M. Sieskind	Physique
G. Monsonego	Physique mathématique
P. Gabriel	Mathématiques

PLAN DU MÉMOIRE

Pages

INTRODUCTION 9

A. — TECHNIQUES ET METHODES 11

I. — Les techniques microscopiques par absorption des Rayons X

II. — La microradiographie par contact. — Le principe ....

III. — Conditions d'application de la microradiographie par contact à l'étude de la cellule

IV. — Appareillage et technique

B. — APPLICATION DE LA MICRORADIOGRAPHIE A L'ETUDE DE LA DIVISION CELLULAIRE 27

I. — Mitose

II. — Méiose

C. — OBSERVATIONS 33

I. — Caryocinèse

II. — Cytocinèse

D. — ANALYSE DES RESULTATS 53

I. — Caryocinèse.

— Les centres organisateurs

— Formation de la fibre chromosomique

— Les mouvements prométaphasiques

— Evolution du fuseau en radiographie et sur le vivant

II. — Cytocinèse.

— La nature des éléments fibrillaires

— Evolution des constituants cellulaires

— Le rôle du fuseau de cytocinèse dans l'édification de la cloison intercellulaire

E. — DISCUSSION ET CONCLUSION 69

BIBLIOGRAPHIE 83

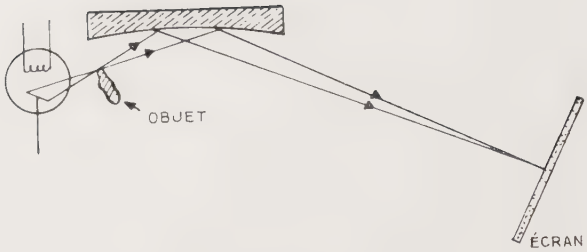
INTRODUCTION

Les modalités et les mécanismes de la division cellulaire, caryocinèse et cytocinèse, ont toujours retenu l'attention des Biologistes. Pourtant, malgré le si grand nombre d'observations faites, nos connaissances relatives à cet ensemble important restent très fragmentaires.

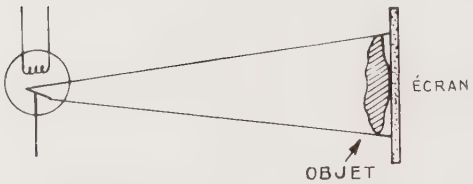
La cytologie par coloration restreint l'information aux seuls éléments susceptibles de fixer un colorant. La mise en œuvre de techniques d'analyse plus récentes a apporté des précisions. Par exemple, la microscopie en lumière polarisée permet de mettre en évidence des orientations parallèles très fines, qui sont précieuses surtout par l'étude du matériel vivant. La microscopie électronique, avec un pouvoir de résolution différent, situe l'investigation à une autre échelle; mais la finesse des coupes, l'exiguité du territoire cellulaire qu'il est possible d'englober dans une observation, rendent difficile l'étude d'ensemble du contenu cellulaire, aussi bien en profondeur qu'en étendue.

Les questions qui restent posées sont si nombreuses et si fondamentales qu'aucune source possible d'information ne doit être négligée.

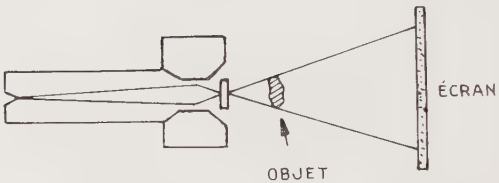
Nous avons pensé que les méthodes d'analyse par absorption des rayons X, qui ont fait des progrès importants au cours de ces dernières années, pouvaient apporter une contribution originale à l'étude des problèmes relatifs à la division. Le pouvoir de résolution est du même ordre que celui de la microscopie optique, l'image cytologique, cependant, obtenue par un mécanisme entièrement différent, révèle des éléments d'observation qui échappent à la cytologie classique.



Microradiographie par réflexion.



Microradiographie par contact.



Microradiographie par projection.

Figure 1. — Principales méthodes microscopiques par absorption des rayons X (schémas d'après ONG SING POEN).

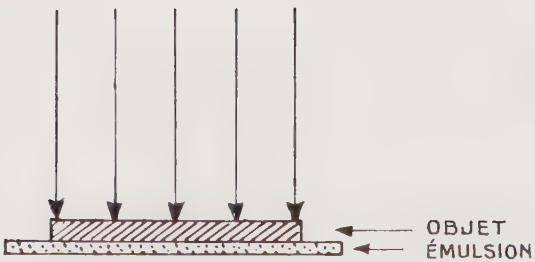


Figure 2.

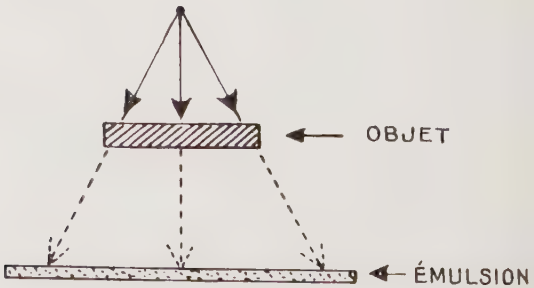


Figure 3.

A - TECHNIQUES ET MÉTHODES.

I. — LES TECHNIQUES MICROSCOPIQUES PAR ABSORPTION DES RAYONS X.

Les techniques microscopiques qui utilisent l'absorption des rayons X se rapportent à trois méthodes fondamentales: la microradiographie «par contact», «par projection» et «par réflexion». La figure (1) schématise le dispositif utilisé pour l'application de chacune de ces trois méthodes.

— La «*microradiographie par réflexion*», basée sur la réflexion totale des rayons X, permet d'obtenir des images par des miroirs convergents. Ce procédé, qui tend à réaliser un véritable microscope à rayons X, avec les avantages que comporte leur faible longueur d'onde, n'a pas encore atteint le stade des applications pratiques.

Le biologiste a le choix entre la «microradiographie par contact» et la «microradiographie par projection». Dans l'un et l'autre cas, l'image obtenue par absorption des rayons X doit être examinée au microscope optique.

— Pour la «*microradiographie par contact*», la préparation est étroitement appliquée contre la couche photosensible; l'image obtenue est de mêmes dimensions que l'objet.

La «*microradiographie par projection*» suppose que la préparation est placée à une certaine distance de l'émulsion; l'image se trouve agrandie du fait de la projection. Les figures 2 et 3 schématisent la marche des rayons dans chacun des deux procédés.

Les dimensions microscopiques des figures à analyser exigent que le matériel soit radiographié sous forme de coupes de quelques microns d'épaisseur. D'autre part, les constituants cellulaires sont de faible densité, puisque composés d'éléments légers (C, O, H, N). Pour obtenir, malgré cette faible densité du matériel et la minceur des préparations, une image bien contrastée, il faut une absorption suffisante des rayons X; pour cela, il est nécessaire d'utiliser des rayonnements de grandes longueurs d'onde, émis sous des tensions d'anode inférieures à 1.000 V.

La microradiographie par contact est seule à permettre l'utilisation des rayons X aussi mous avec une intensité suffisante. La microradiographie par projection exige, en effet, que soit appliquée au tube une tension beaucoup plus élevée (environ 4.000 V.), ce qui fournit un rayonnement trop pénétrant, inutilisable pour l'analyse des cellules en division qui font l'objet de notre étude. La méthode par contact permet, d'autre part, l'irradiation uniforme de plus grandes surfaces.

II. — LA MICRORADIOGRAPHIE PAR CONTACT. LE PRINCIPE.

La microradiographie par contact est basée sur l'absorption différentielle des rayons X par les divers constituants d'un objet microscopique.

La préparation, placée au contact intime d'une émulsion photographique à grain fin, est exposée à un faisceau incident de rayons X. La dureté du rayonnement étant convenablement choisie, le faisceau est affaibli par certaines parties absorbantes. Le rayonnement transmis impressionne la couche photosensible où, après développement, apparaît une image dont les dimensions sont celles de l'objet.

Les informations fournies.

Cette image obtenue par action sur une surface sensible d'un rayonnement transmis ne pourra être interprétée qu'en tenant compte des lois qui régissent l'absorption des rayons X.

Un faisceau parallèle de rayons X monochromatiques subit, en traversant la matière, un affaiblissement exprimé par la relation:

$$I = I_0 \, e^{-\mu m} \qquad (1)$$

dans laquelle I_0 et I représentent respectivement l'intensité du faisceau incident et celle du faisceau transmis, m la masse par unité de surface (fonction de la densité et de l'épaisseur), et μ le coefficient d'absorption de la substance traversée.

Le coefficient d'absorption μ varie avec la longueur d'onde λ du rayonnement et le numéro atomique Z des éléments constituants suivant la relation:

$$\mu = C \, \lambda^3 \, Z^4 \qquad (2)$$

dans laquelle C est une constante.

Par le choix d'une longueur d'onde convenable, il est possible d'obtenir une image microradiographique d'une préparation de matériel biologique. Cette image peut nous fournir des informations de différents ordres:

De manière immédiate, elle nous renseigne sur la forme géométrique de l'objet: par exemple, des structures cellulaires peuvent apparaître par leurs seules différences d'opacité aux rayons X. Ces différences d'absorption pour un rayonnement donné sont liées à la fois à la densité et à la composition chimique élémentaire des régions absorbantes, en vertu des relations rappelées plus haut. Alors que les méthodes de coloration utilisées en microscopie optique sont basées sur des affinités chimiques souvent incertaines, l'image microradiographique rend visibles les structures, grâce à l'absorption de rayonnement X qui est un phénomène physique, obéissant à des lois connues. L'intérêt essentiel d'une analyse descriptive par microradiographie est de révéler des structures qui échappent aux méthodes de la microscopie optique.

Dans une étape ultérieure, l'image microradiographique permet de relier les signaux d'absorption à la masse. Selon la relation (2), pour une longueur d'onde donnée, le coefficient d'absorption μ d'une substance dépend uniquement de sa composition chimique élémentaire. Si, dans une préparation, nous sommes en présence d'une plage uniforme d'une substance déterminée, la composition chimique y sera partout la même et, par conséquent, aussi la valeur de μ. Les variations d'absorption, qui peuvent se manifester d'un point à l'autre de cette plage par des différences d'opacité, ne pourront être dues, selon la relation (1), qu'à des variations du facteur m, c'est-à-dire de la densité, puisque, s'agissant d'une coupe, l'épaisseur est uniforme.

Il devient même possible d'effectuer des mesures absolues de poids sec par des méthodes photométriques sur des surfaces aussi réduites que le micron-carré, et portant sur des valeurs de l'ordre du micro-microgramme. On peut ainsi envisager d'utiliser la microradiographie comme méthode d'analyse quantitative de masse.

En rayonnement continu, on utilise à cet effet un système de référence formé de feuilles de nitrocellulose disposées «en escalier» et exposées en même temps que la préparation. On mesure sur l'image microradiographique la densité photographique due à l'absorption de l'objet et celle du système de référence. Lorsqu'il y a égalité d'absorption, le poids sec, par unité de surface de l'objet, est donné par la relation:

$$m\ (\text{objet}) = \frac{\mu\ (\text{réf.})}{\mu\ (\text{obj.})} \times m\ (\text{réf.})$$

dans laquelle

m = poids par unité de surface

μ = coefficient d'absorption.

(Schémas fig. 4 et fig. 5)

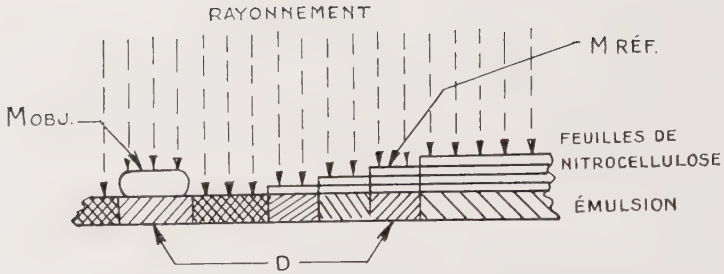


Figure 4. — Schéma du dispositif: objet et système de référence (reproduit d'après HENKE, 1958, p. 129).

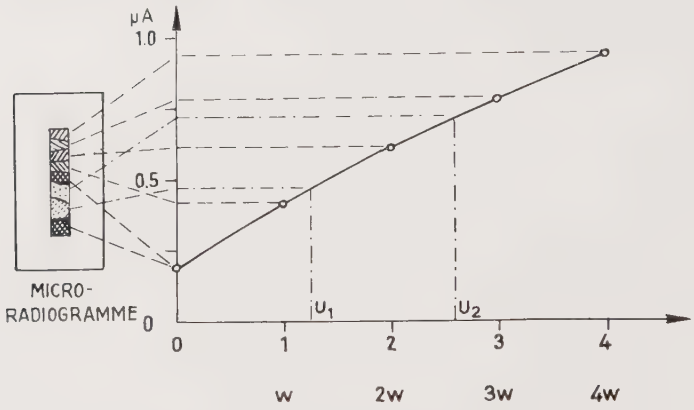


Figure 5. — Représentation schématique de la méthode d'évaluation de poids sec en fonction de l'intensité d'absorption (d'après LINDSTRÖM, 1955, p. 65).

— abcisses: poids (w = weight) (1, 2, 3: valeurs de référence);
— ordonnées: valeurs photométriques correspondant aux intensités d'absorption;
— microradiogramme de l'ensemble: objet et matériel de référence.

Il faut enfin mentionner les possibilités qu'offre la microradiographie pour une analyse chimique *in situ*, puisque certains éléments peuvent être mis en évidence par les discontinuités d'absorption des rayons X; on en verra un exemple plus loin pour l'Oxygène (fig. 6).

III. — CONDITIONS D'APPLICATION DE LA MICRORADIOGRAPHIE PAR CONTACT A L'ETUDE DE LA CELLULE.

Pour que soit possible une étude du contenu cellulaire par microradiographie, trois conditions essentielles doivent être remplies. Elles ont déjà été évoquées pour justifier le choix de la méthode par contact: les coupes doivent être minces, la longueur d'onde convenablement choisie pour obtenir une image bien contrastée, la résolution de l'image doit être telle qu'on retrouve tous les détails que peut séparer le microscope optique.

L'exigence de *coupes minces* est imposée par le fait que la radiographie obtenue par contact est la projection sur un plan (la surface de l'émulsion), d'une préparation-objet qui a une certaine épaisseur. En tenant compte de la taille des cellules et de la nature des constituants étudiés, nous avons fait des coupes dont l'épaisseur variait de 2 à 5 μ. Afin d'éviter la superposition de structures situées à des niveaux différents de la préparation, les coupes de 3 μ ont été utilisées dans la plupart des cas. On peut remarquer en passant que, dans ces conditions, la microradiographie offre une image plane dont l'observation au microscope est plus facile que celle de la coupe qui l'a fournie: même aux plus forts grossissements, tous les détails de structure peuvent être examinés dans un même plan focal sans qu'il soit nécessaire de faire une mise au point en profondeur.

Les préparations que nous analysons se caractérisent par leur faible épaisseur, et le matériel cellulaire par la faible densité des éléments qui entrent dans sa composition. Une image bien contrastée, qui est nécessaire à notre étude, peut s'obtenir si l'absorption est suffisante, autrement dit, d'après ce qui précède, si le coefficient μ a une valeur élevée. La relation $\mu = C \lambda^3 Z^4$ montre que c'est par la valeur de λ qu'on peut intervenir, et qu'il faut utiliser des rayonnements de *grande longueur d'onde.*

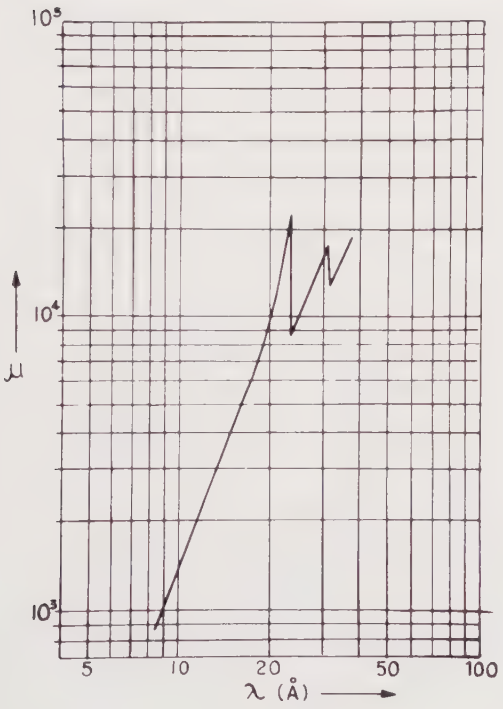


Figure 6. — Variation du coefficient d'absorption en fonction se la longueur d'onde, pour une protéine banale (selon HENKE).

A titre d'exemple, sur la courbe de la fig. 6, on peut voir que le coefficient d'absorption d'une protéine banale présente ses valeurs maxima pour les valeurs de λ voisines de 20 Å. Dans la région de 23,3 Å, se situe la discontinuité d'absorption de l'Oxygène.

Pour notre matériel cytologique, des rayonnements de longueurs d'onde comprises entre 15 à 23 Å ont été les plus favorables.

Figures 7 et 8. — D'après HENKE, 1958, p. 123.

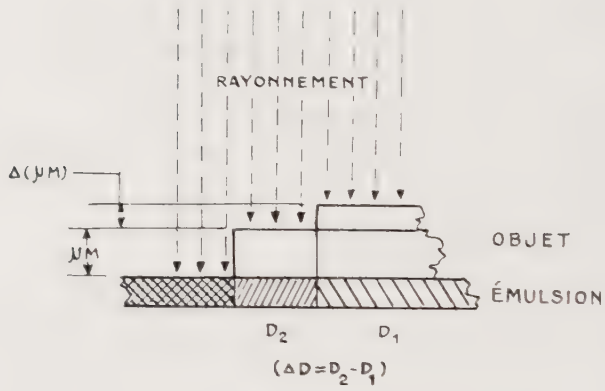


Figure 7.

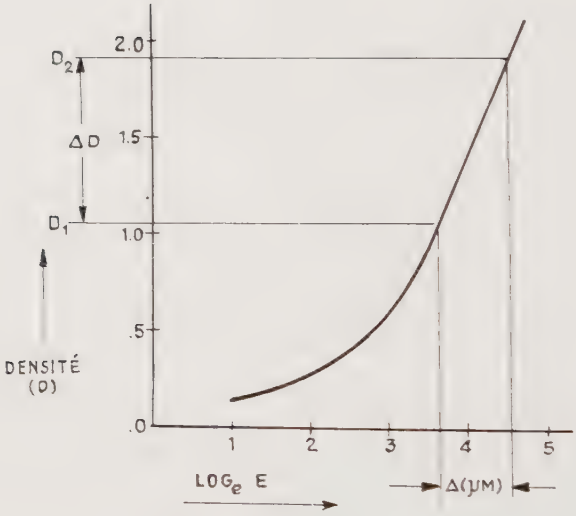


Figure 8

Le contraste de l'image.

L'image microradiographique de l'objet hétérogène qu'est une coupe cellulaire se présente comme une juxtaposition de plages dont les densités optiques sont différentes. Ces variations dans l'intensité du noircissement sont la traduction photographique des différences d'absorption qu'a subi le rayonnement incident en traversant chaque partie de la coupe. Ce sont donc les variations du paramètre d'absorption μm qui sont en cause. Aux plages les plus sombres de l'image, correspondent les parties de l'objet les plus perméables au rayonnement, aux plages les plus claires, correspondent les parties les plus opaques.

Pour que deux structures voisines apparaissent sur l'image sous la forme de deux plages distinctes, il faut qu'il existe de l'une à l'autre une différence dans la valeur de μm. Elles apparaîtront d'autant plus nettement distinctes que la différence $\Delta \mu m$ se manifestera par une plus grande différence de densité photographique D (fig. 7).

Les deux valeurs d'impression photographique (ou densité) D_1 et D_2, correspondant aux deux valeurs du paramètre μm_1 et μm_2 sont aussi conditionnées par la photographie elle-même: caractéristiques de l'émulsion et procédé de développement.

Henke (1958) a précisé la relation qui existe entre la densité photographique et l'absorption pour une émulsion donnée, développée dans des conditions définies. Le «contraste visuel», soit

$$C_v = -\frac{d D}{d \mu m}$$

a sa valeur maxima, d'après le graphique, pour la plus grande pente de la courbe qui exprime la densité photographique (D) en fonction de l'absorption (fig. 8).

L'application satisfaisante de la microradiographie à l'étude des structures cellulaires, suppose que le *pouvoir de résolution* de l'image approche le plus possible celui du microscope optique. En microradiographie par contact, deux facteurs sont susceptibles de limiter la résolution: *la pénombre*, liée à la marche des rayons, et *la nature granuleuse de l'émulsion*.

La pénombre.

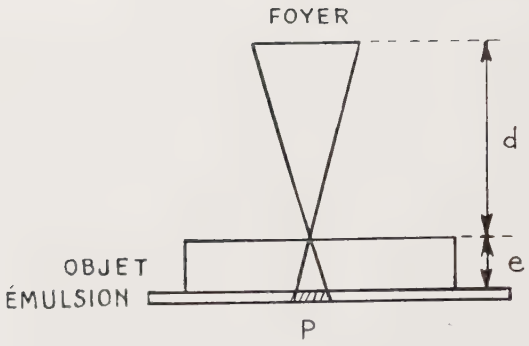


Figure 9. — Schéma de la marche des rayons et formation de la pénombre.

Le schéma montre que l'image d'un point, situé sur la face extérieure de la coupe, est accompagnée d'une zone de pénombre P. Les variations de P en fonction des dimensions du dispositif sont données par la relation suivante:

$$P = \frac{fe}{d}$$

Remarque: L'épaisseur de l'émulsion (e') devrait théoriquement être envisagée. Mais les rayons ultra-mous que nous avons utilisés sont absorbés surtout par la couche superficielle de l'émulsion. La valeur e' peut donc être négligée.

Pour que la pénombre ne devienne pas une limite à la résolution, les valeurs de f, e, d, doivent être telles que la dimension de P ne dépasse pas 0,2 μ qui mesure le pouvoir séparateur du microscope optique.

Avec un foyer de 5 mm de diamètre, une épaisseur de coupe de 3 μ, la distance foyer-objet ne peut donc être inférieure à 75 mm.

Le «grain» de l'émulsion.

La recherche de matériel radiosensible homogène s'est poursuivie activement au cours des dernières années et se poursuit encore dans le but de perfectionner de plus en plus les possibilités d'utilisation de microradiogrammes (Pattee, Asunmaa, 1960). Bien que diverses préparations radiosensibles aient déjà été proposées, l'émulsion photographique reste, actuellement, pour les applications pratiques, le seul enregistreur des microradiogrammes. Or, les meilleures émulsions dont on dispose et dans lesquelles les cristaux élémentaires de Bromure d'Argent ne dépassent pas 50 m μ, fournissent une image développée qui présente un aspect plus ou moins granuleux à l'examen microscopique. Un granulé se forme au cours du développement, par un groupement de particules provenant des cristaux primitifs. Ce n'est d'ailleurs pas uniquement la taille des cristaux primitifs

puis des granules formés qui intervient, mais aussi leur nombre et l'uniformité de leur distribution dans la couche de gélatine.

Il n'existe que peu d'émulsions pouvant répondre aux exigences d'homogénéité nécessaire au milieu radiosensible. Nous avons utilisé trois catégories de préparations:

Kodak 649 — o
Kodak «Maximum Resolution»
Gevaert-Scientia 5 E — 56

dont le pouvoir de résolution spatiale dépasse 1.000 lignes par mm.

Il faut noter pourtant que l'aspect granuleux de l'image microscopique n'est pas exclusivement conditionné par les qualités propres de l'émulsion. Il dépend aussi, pour une part importante, des *conditions de traitement.*

a) *Le choix du révélateur.*

L'influence du révélateur est primordiale; les meilleurs résultats furent obtenus avec des révélateurs «Refinex» et «Nogranol» de Gevaert, et «Migrol» de Kodak.

b) *Les conditions techniques.*

Le développement à température trop élevée, ou de trop longue durée, provoque une nette accentuation de l'aspect granuleux de l'image. Il y a également intérêt à réduire au maximum les temps de passage dans les bains de fixation et de lavage.

Sans ces précautions, l'importance du granulé peut être telle qu'elle interdit un examen utile de l'image à des grossissements supérieurs à 400 ou 500.

Mais l'importance du «grain» est relative: sur un même microradiogramme, l'aspect granuleux perd de son importance sous le microscope dans les plages de la préparation où le contraste est fort, lorsque sont juxtaposées parties lumineuses et parties obscures.

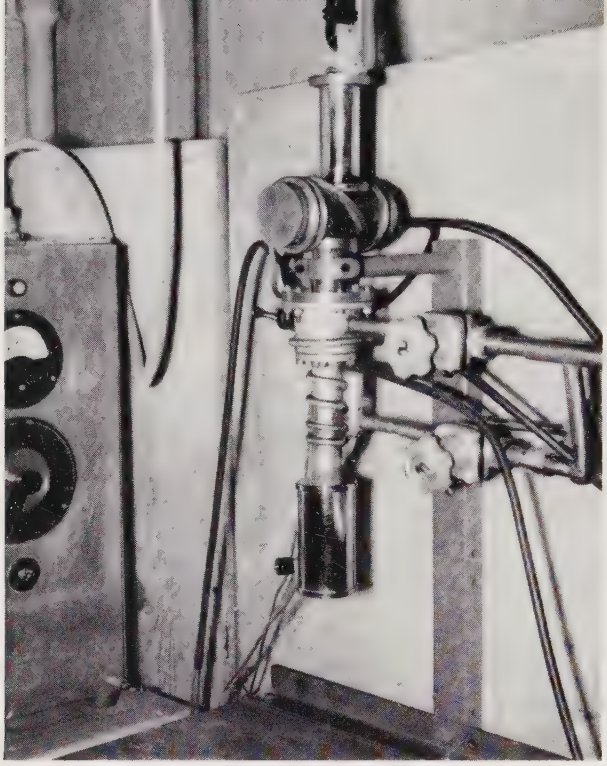


Figure 10. — Tube à Rayons X ultra-mous.
(Laboratoire de Minéralogie — Faculté des Sciences de Strasbourg.)

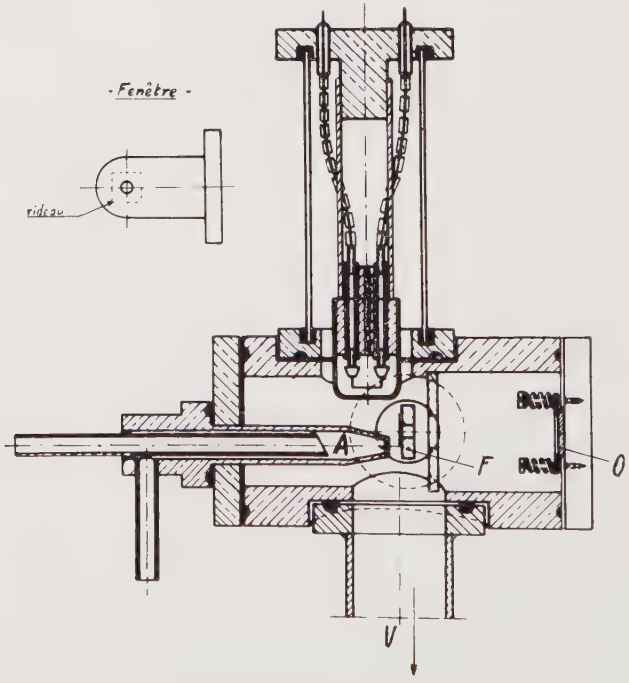


Figure 11. — Schéma du tube. A, anticathode; F, fenêtre; O, objet; V, canalisation de vide.
(Reproduit: «X-Ray microscopy and...» — Proc. int. Cong. Stockholm **1960**, p. 307).

IV. — APPAREILLAGE ET TECHNIQUES.

1° Le tube à Rayons X.

Ce que nous savons de l'absorption des rayons X et des caractéristiques du matériel cytologique nous a précédemment conduit à considérer que les longueurs d'onde utiles sont comprises entre 15 et 23 Å, pour les observations que nous nous proposons. Un générateur à rayons X ultra-mous a été conçu par M. le Professeur Goldsztaub, et construit sous sa direction au Laboratoire de Minéralogie de la Faculté des Sciences de Strasbourg.

Le tube démontable réunit dans une même enceinte, vidée pour chaque exposition, le filament, l'anticathode en cuivre, et l'ensemble émulsion-préparation monté sur un chassis porte-objet (fig. 11).

Une feuille d'Aluminium de 1 μ d'épaisseur a été interposée entre l'anticathode et le chassis porte-objet, pour éviter que les radiations lumineuses émises par le filament incandescent ne viennent impressionner l'émulsion. Ce rideau arrête efficacement le rayonnement visible, mais reste perméable aux rayons X de grandes longueurs d'onde utilisés. En même temps, il joue le rôle de filtre en arrêtant les rayons les plus mous du spectre. Le vide est nécessaire dans l'enceinte du tube pour éviter l'absorption du rayonnement ultra-mou sur le trajet foyer-préparation; il est réalisé par une pompe à palettes et une pompe à diffusion d'huile montées en série. Le refroidissement de l'anticathode et du corps du tube, est assuré par une circulation d'eau.

L'appareil est capable de fonctionner sous des tensions d'anode situées dans l'intervalle 500 à 3.000 V. Nous avons utilisé, suivant l'épaisseur des coupes, des tensions variant entre 700 et 1.000 V. Le plus souvent, nous avons cherché à rester près de 800 V, de manière à obtenir un rayonnement aux intensités efficaces, situées à proximité d'une longueur d'onde de 20 Å.

Nous savons que la longueur d'onde la plus courte λ_0 du rayonnement émis est déterminée par la relation

$$\lambda_0 = \frac{12{,}4}{V \text{ (kilovolts)}}$$

Dans le domaine des rayons X ultra-mous, la distribution est relativement étroite et présente un fort maximum des intensités pour les longueurs d'onde de valeur un peu inférieure à $3/2\ \lambda_0$ (fig. 12). Si la tension appliquée au tube est de 800 V, $\lambda_0 = 15{,}5$ Å et les maxima d'intensité se situent entre $\lambda = 18$ Å et $\lambda = 22$ Å.

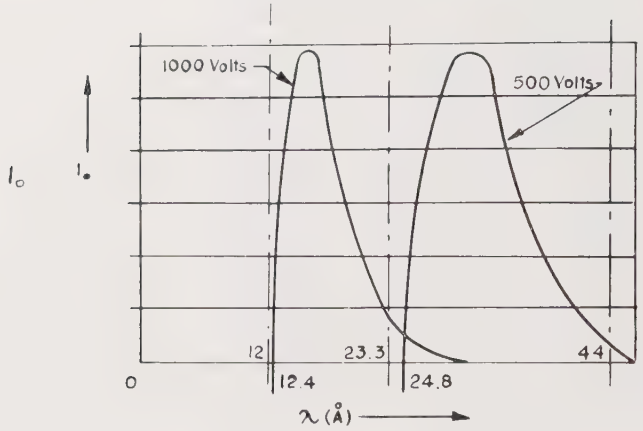


Figure 12. — Distribution des intensités dans le cas d'un rayonnement continu émis sous une tension de 1.000 à 500 V. (selon HENKE).

2° Le processus opératoire.

Bien que la microradiographie de la cellule à l'état vivant soit un objectif à atteindre, elle n'est pas encore réalisable dans l'état actuel des possibilités techniques. La nécessité d'utiliser des rayonnements de très faible pénétration et, donc, de très faible énergie, impose, malgré les progrès déjà réalisés, des temps d'exposition relativement longs pendant lesquels la cellule doit être soumise à des conditions de vide très poussé, incompatibles avec la vie. On se voit donc obligé de passer par les étapes habituelles de la fixation, de la déshydratation et de l'inclusion. Comme ces opérations comportent le risque d'altérations de structure, ou de pertes de substances, il est nécessaire d'y procéder avec le plus grand soin, selon les techniques cytologiques reconnues actuellement comme les plus sûres.

La fixation.

La fixation du matériel destiné à être radiographié a fait l'objet d'une attention particulière.

L'importance des structures extranucléaires révélées par les images microradiographiques obligeait à s'assurer de la meilleure conservation possible de tous les constituants cellulaires. Les transformations mises en évidence par cette méthode au cours de la division ne devaient pas être imputables au traitement des cellules. Nous avons donc utilisé les fixateurs mis au point en cytologie pour les observations caryologiques et pour l'étude de constituants cytoplasmiques.

En raison du principe même de la méthode, qui consiste en analyse d'une microradiographie, il fallait tenir compte de la composition des mélanges fixateurs contenant des éléments denses.

(1) *A l'acide osmique:*

	Flemming	Benda	
acide chromique 1%	5,5 cc	15 cc	(fixation avec
acide osmique 2%	1 cc	4 cc	ou sans acide
acide acétique glacial	1 goutte	3 gouttes	acétique)
eau distillée	14 cc	—	

(2) *Au formol:*

	Navashin	Randolph
acide chromique 2%	100 cc	100 cc
acide acétique 20%	100 cc	70 cc
formol 40%	80 cc	60 cc
eau distillée	20 cc	170 cc

(3) *A l'alcool:*

	Alcool acétique	Carnoy
alcool absolu	100 cc	100 cc
acide acétique glacial	33 cc	16 cc
chloroforme pur	—	50 cc

(4) *Au chlorure de Cadmium:* mélange de Sato.

alcool à 50°	100 cc
chlorure de Cadmium	1 g

(5) *Au Permanganate de Potassium:*

Solution de permanganate de Potassium à 2%.

A cet effet, des échantillons d'un même matériel, riches en stades de division très variés (anthères en méiose de *Listera*, de *Lilium*, méristèmes radiculaires de *Nothoscordon*, d'*Allium*), ont été fixés simultanément dans les mélanges dont la composition est exposée ci-contre.

La radiographie des différents échantillons et le développement des microradiogrammes ont été effectués dans les mêmes conditions, et les images comparées entre elles.

De cette étude, on peut tirer les conclusions suivantes:

1. Lorsqu'on utilise un mélange fixateur contenant des éléments denses (Os, Mn, Cr), il est indispensable de procéder à un lavage soigneux du matériel fixé de manière à éliminer aussi complètement que possible les éléments lourds apportés par le fixateur. Cette précaution est d'autant plus importante que le rayonnement utilisé est plus mou. Une élimination insuffisante est cause d'une absorption anormalement élevée, l'analyse des images devient impossible.

2. L'usage de fixateurs contenant uniquement des éléments légers (C, O, H, dont le matériel biologique lui-même est constitué), permet d'obtenir des images qui, avec les divers mélanges utilisés, ne montrent pas de différences perceptibles en optique ordinaire, au pouvoir de résolution de notre méthode.

La préparation des échantillons.

La préparation des échantillons, pour l'exposition aux rayons X, a été faite en se basant sur les indications techniques de Greulich & Engström (1956). Elle comprend les opérations suivantes, qui doivent être effectuées en lumière rouge:

1° Les coupes de matériel inclus dans la paraffine sont déplissées sur l'eau distillée à 45°, puis recueillies directement sur l'émulsion d'une plaque photographique, réduite aux dimensions utiles.

2° Par trempage préalable de la plaque dans une solution de nitrocellulose (1%) dans un mélange à parties égales d'alcool et d'éther, l'émulsion a été recouverte d'une fine pellicule protectrice. Du fait de sa très faible épaisseur (de l'ordre de 0,1 μ), et de sa composition chimique — (elle n'est formée que d'éléments légers) — son absorption est négligeable.

3 Après un séchage à l'air de 6 heures, les coupes, ainsi collées sur l'émulsion, sont déparaffinées dans le benzène. Les impuretés de la paraffine peuvent être éliminées par un passage dans une série décroissante d'alcools de 100 à 50°, suivi d'un retour à l'alcool absolu par une série inverse; mais cette opération comporte des risques de décollement des coupes.

4 Après un nouveau temps de séchage de 30 minutes, l'ensemble coupe-émulsion est prêt pour être exposé aux rayons X.

5 La plaque impressionnée est plongée durant 3 à 5 minutes dans l'acétone où la pellicule de nitrocellulose est dissoute. La coupe se détache alors facilement de l'émulsion. Celle-ci, après un passage d'une minute dans l'eau, est développée et fixée.

Le contrôle de l'image microradiographique.

La comparaison nécessaire de l'image microradiographique avec une image obtenue par coloration du même matériel se fait de deux manières:

Une coupe voisine de celle qui est prise pour la radiographie est gardée comme témoin et traitée selon une méthode cytologique habituelle de coloration avec l'hématoxyline ou la réaction de Feulgen.

Il est possible de récupérer les coupes mêmes qui ont été radiographiées. Normalement, elles se détachent de la surface de l'émulsion dans le bain d'acétone sans subir de dommages; avec quelques précautions, on arrive à les recueillir sur une lame pour les colorer au moyen du Feulgen par exemple. Il est alors possible de confronter, élément par élément, la section colorée à sa propre image radiographique (fig. 13).

Allium cepa.

Figure 13. — Mitoses somatiques dans les pointes de racines.
(a) métaphase, (b) anaphase.
A gauche, image microradiographique; à droite, coloration au Feulgen, après récupération de la coupe. (× 1.500.)

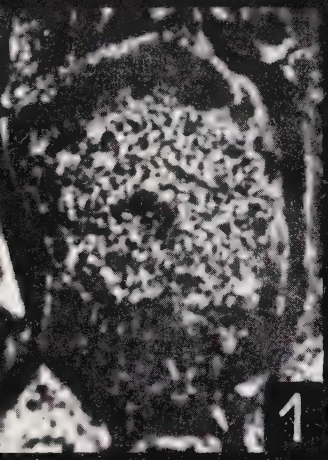
B - APPLICATION DE LA MICRORADIOGRAPHIE A L'ÉTUDE DE LA DIVISION CELLULAIRE.

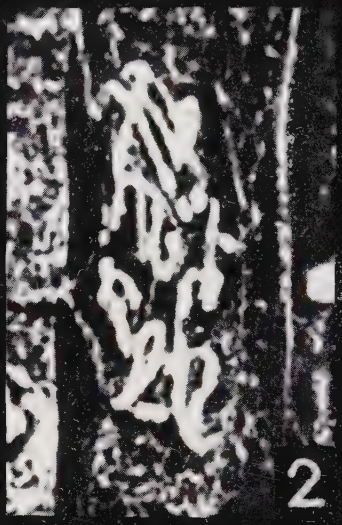
La division de la cellule se réalise par un ensemble de processus complexes qui se déroulent de façon continue. Pour les besoins de l'analyse, on distingue classiquement: la division du noyau ou caryocinèse, et la division du cytoplasme ou cytocinèse.

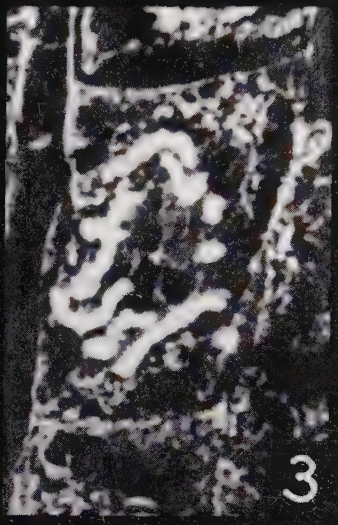
L'évolution cinétique affecte la cellule dans sa totalité. Elle nous est perceptible par des modifications de structure et des mouvements de rapidité inégale. Des films célèbres en ont illustré les étapes sur le vivant et nous ont donné une notion de leurs durées respectives. Les observations sur le vivant, faites au cours de ce travail, ont été chronométrées (fig. 26). C'est surtout l'étude du matériel chromatique qui a permis de distinguer, depuis les origines de la caryologie, les étapes de la caryocinèse définies comme: prophase, métaphase, anaphase et télophase, en fonction des transformations morphologiques que subissent les chromosomes et des mouvements qu'ils exécutent.

Ce matériel chromatique, très fortement absorbant dans les conditions de notre étude, présente sur les microradiographies les mêmes contours qu'en coloration. Les cellules engagées dans le processus de division fournissent donc des microradiogrammes dont les photographies groupées dans les Pl. I et II permettent de reconnaître d'emblée les étapes connues des cytologistes.

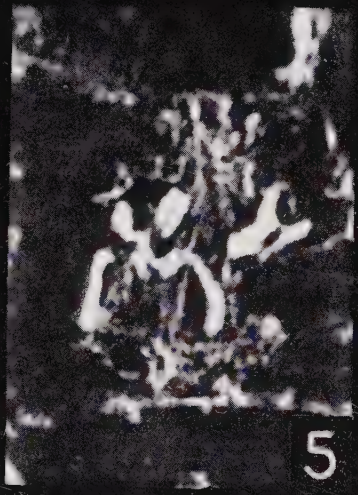
D'autre part, la microradiographie, en rendant perceptibles les changements qui interviennent simultanément au niveau des constituants cellulaires non colorables, permet une étude plus complète de l'évolution globale de la cellule au cours de sa division.

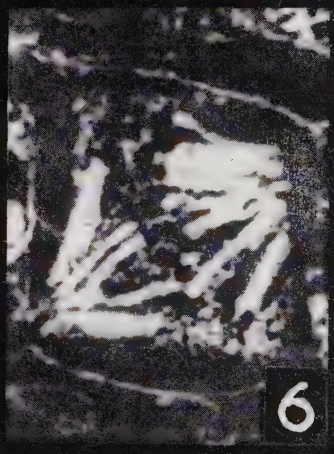

1

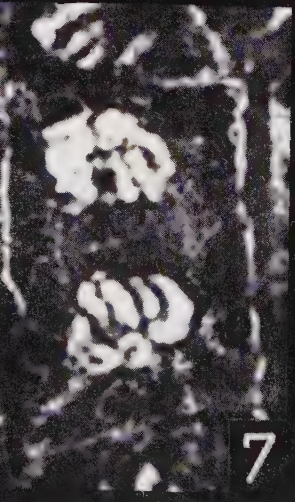

2

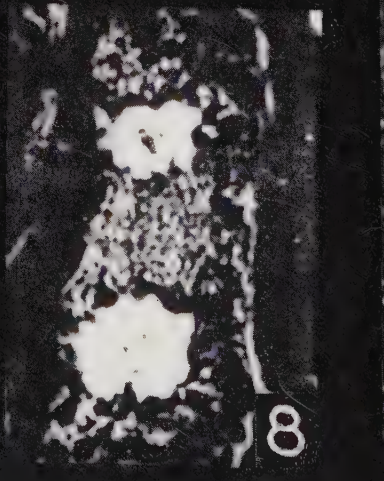

3

4


5


6


7


8

9

Planche I. — MITOSE.

Etapes de la mitose: méristème radiculaire de *Nothoscordon inodorum* (Ait.) Asch. & Graebn.

Fixation: alcool-acétique (3/1); Coupes d'épaisseur 3 μ; Tension d'anode: 850 V. Microradiogramme photographié avec objectif à immersion × 100; Gross. × 1.400.

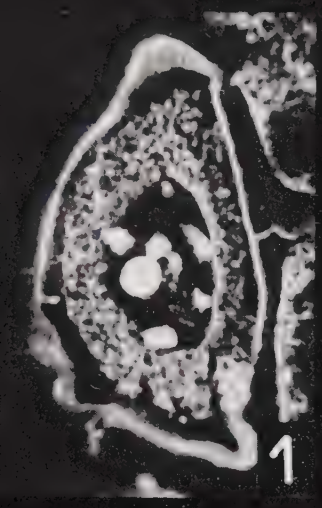
Fig. 1, 2, 3: Etapes de la prophase: évolution morphologique des chromosomes (enroulement, épaississement), disparition progressive du nucléole et de l'individualité morphologique du noyau.

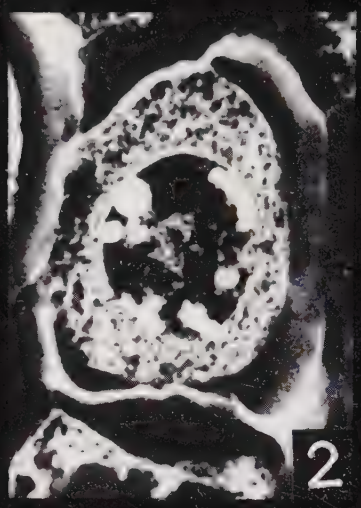
Fig. 4: Prométaphase: mise en place progressive des chromosomes.

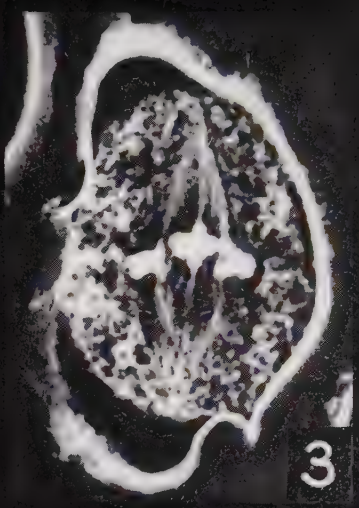
Fig. 5: Métaphase: aspect classique de disposition des chromosomes avec centromères sur le plan équatorial et clivage apparent au niveau des bras.

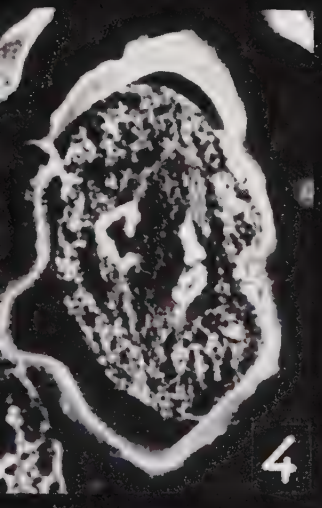
Fig. 6: Anaphase: distribution aux deux pôles des chromosomes en deux groupes symétriques.

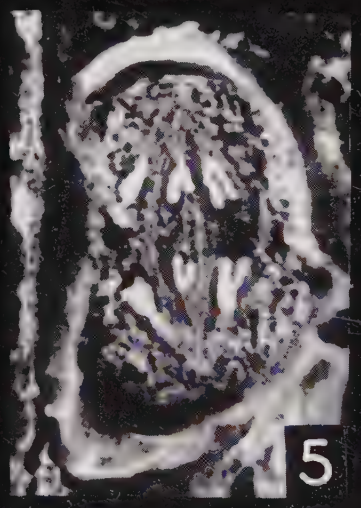
Fig. 7, 8, 9: Télophase: évolution des chromosomes et retour à la constitution de noyaux individualisés; simultanément formation de la cloison, fin de cytocinèse.

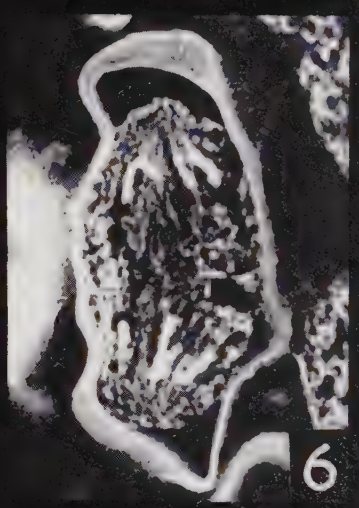

1

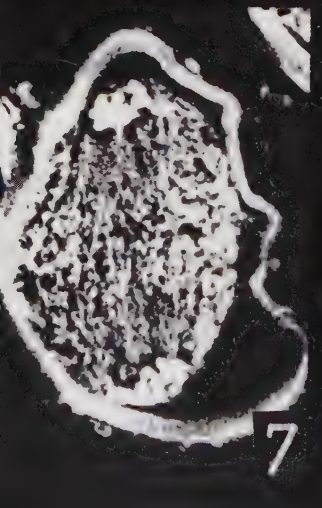

2

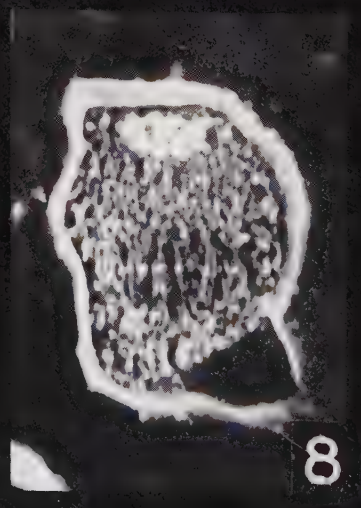

3


4


5


6


7


8

9

Planche II. — MEIOSE.

Etapes de la Cinèse I: anthères de Lilium candidum L.;
(Gross. × 1.000).

Fig. 1, 2: Fin de diplotène et diacinèse: bivalents et nucléole dans la sphère du noyau.

Fig. 3: Métaphase I: bivalents disposés sur le plan équatorial.

Fig. 4, 5, 6: Anaphase I: étapes de la distribution symétrique des homologues aux pôles.

Fig. 7, 8, 9: Télophase I: évolution des chromosomes, retour à la constitution de vésicules nucléaires; formation de la cloison de cinèse I.

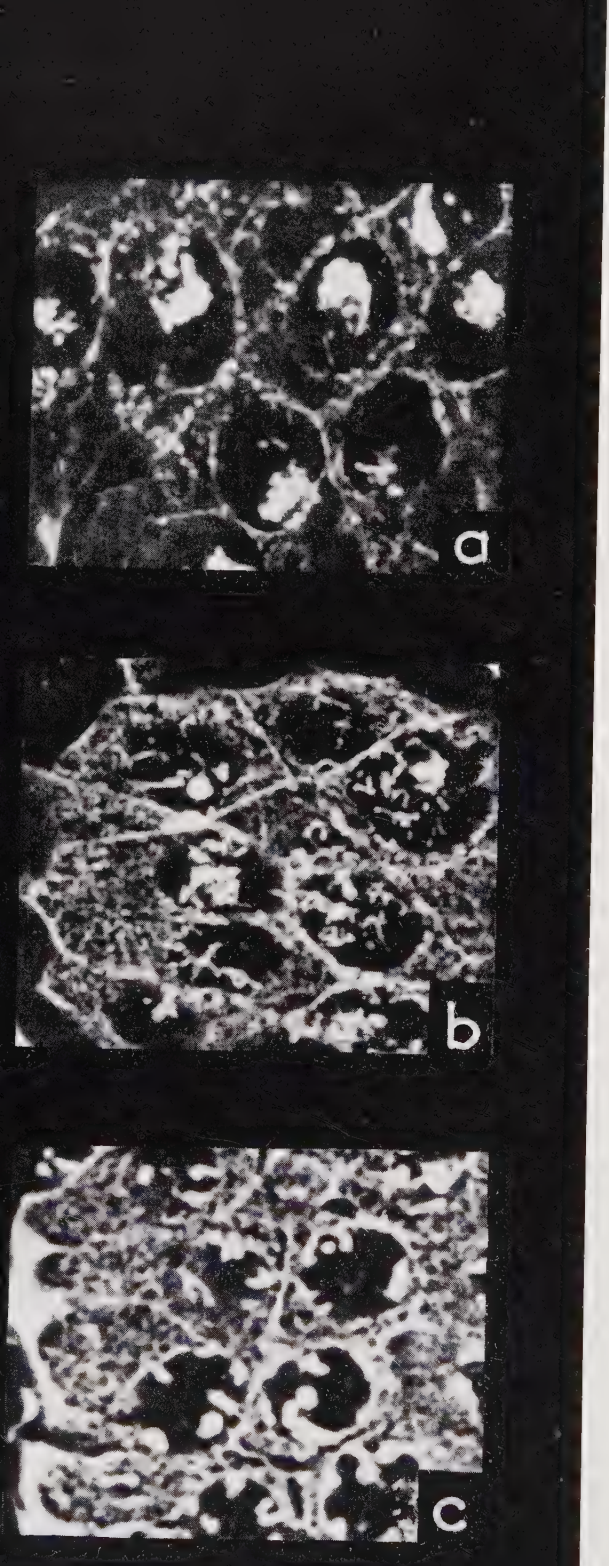


Figure 14.

Listera ovata — Méiose.
a, b, c: évolution du cytoplasme au cours de la prophase I.
(× 1.000)

C - OBSERVATIONS

Les informations recueillies concernent d'une part la caryocinèse, en mitose ou méiose, d'autre part la cytocinèse, et pour les deux, nous envisagerons successivement la formation de l'appareil cinétique et son évolution.

I. — CARYOCINESE.

Apparition de l'appareil cinétique.

En prophase, lorsque le noyau est individualisé, la microradiographie permet de mettre en évidence des différenciations qui apparaissent, les unes au niveau du cytoplasme, les autres à l'intérieur du noyau.

a) *Cytoplasme:*

Sur les images radiographiques obtenues dans les conditions expérimentales définies plus haut, le cytoplasme apparaît formé de deux composantes: une substance fondamentale transparente au rayonnement, des éléments figurés absorbants qui y sont immergés (fig. 14). La forme et les dimensions véritables de ces inclusions ne peuvent généralement pas être analysées avec précision: elles se trouvent à la limite du pouvoir de résolution. Il est cependant presque toujours possible de reconnaître des éléments allongés d'aspect vermiculaire, irrégulièrement contournés. Leur épaisseur peut être estimée comme inférieure à 0,5 μ, leur longueur peut atteindre plusieurs microns; ils forment souvent une trame étroitement enchevêtrée qui prend l'aspect d'un «squelette» cytoplasmique. Ces images, bien qu'à une échelle différente correspondent vraisemblablement à l'ensemble structural permanent du cytoplasme analysé avec précision par la microscopie électronique: reticulum endoplasmique, mitochondries et inclusions. Comme on peut s'y attendre, l'aspect de cette phase absorbante du cytoplasme varie beaucoup d'un type de cellule à un autre et dans une même cellule, au cours de son évolution.

En prophase, trois observations peuvent être faites par microradiographie au niveau du cytoplasme: une augmentation de l'absorption, surtout au cours de la méiose, l'apparition de structures rayonnantes et une orientation bipolaire affectant une partie importante du cytoplasme.

En suivant l'évolution des cellules-mères en méiose, on remarque une augmentation importante et régulière de l'absorption du cytoplasme. Les photographies de la fig. 14 permettent de le constater sur des coupes de cellules-mères de *Listera ovata*, arrivées à différents stades de prophase et

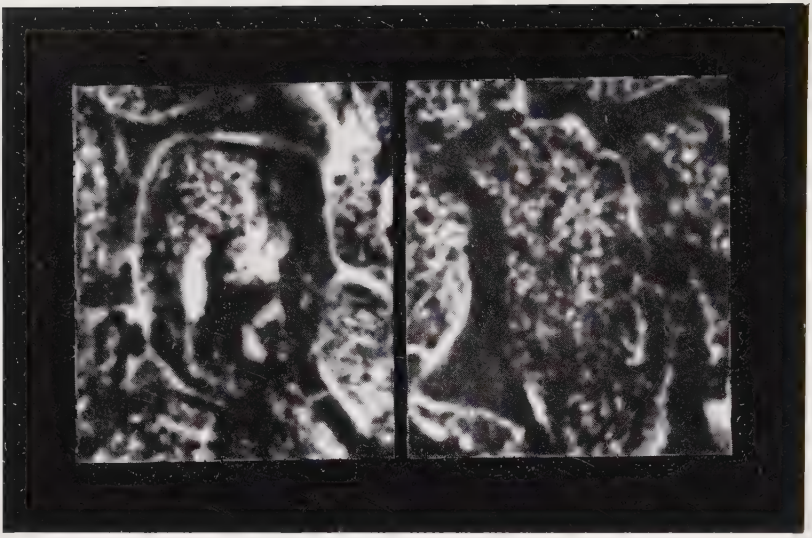


Figure 15. — Structures rayonnantes dans le cytoplasme en fin de prophase; Cellules-mères de *Listera ovata*. (× 1.500.)

Figure 16. — *Hyacinthus* (× 1.600); *Nothoscordon* (× 1.400). Orientations cytoplasmiques de part et d'autre du noyau en fin de prophase; divisions dans les méristèmes radiculaires.

radiographiées dans des conditions expérimentales identiques. L'augmentation de l'absorption se présente comme s'il se produisait une multiplication progressive des éléments figurés du cytoplasme; rares au début, ils deviennent très abondants et forment un ensemble très serré en fin de prophase.

Aussi bien en mitose qu'en méiose, on peut observer la présence de structures en disposition rayonnante dans le cytoplasme des cellules arrivées à un stade avancé de la prophase. A partir d'un point, se distribuent des «rayons» qui ont l'aspect de stries (fig. 15). Du matériel cytoplasmique absorbant est le plus souvent orienté radiairement en périphérie; les «rayons» peuvent alors se prolonger sur une plus grande distance. Il est probable que les deux aspects correspondent à des stades successifs. On peut parfois distinguer un centre de la structure, marqué par un point absorbant; mais l'observation d'un granule défini au point central se présente comme une chance exceptionnelle.

Les régions du territoire cytoplasmique dans lesquelles se rencontrent ces formations correspondent à celles qui seront normalement occupées en métaphase par les pôles du fuseau. Dans les cellules méristématiques des pointes de racines qui ont une section rectangulaire, on les trouve généralement de part et d'autre du noyau sur l'axe principal de la cellule.

L'observation de ces images est rare. Il est probable que ces formations ne sont visibles que durant une période relativement courte de l'évolution prophasique, peu antérieure à la disparition de la membrane nucléaire. La faible épaisseur des coupes (3 μ) par rapport aux dimensions de la cellule (20 à 25 μ), et l'orientation quelconque du plan de section réduisent considérablement les chances d'observation de ces structures rayonnantes. La superposition des images dans un même plan — propre à la radiographie — rend souvent difficile l'analyse des structures cytoplasmiques en fin de prophase où celles-ci sont très serrées.

Une orientation bipolaire des éléments cytoplasmiques a été observée généralement en fin de prophase. Elle prend l'aspect d'un alignement plus ou moins net d'éléments absorbants selon un axe de la cellule. La convergence de ces lignes d'orientation vers les régions polaires est très apparente. La fraction du cytoplasme qui subit cette orientation est variable d'un matériel à l'autre. Dans les cellules-mères en prophase de méiose de *Listera ovata*, c'est la presque totalité du cytoplasme cellulaire qui est ainsi orienté. Dans *Lilium candidum* au contraire, cette orientation est moins accentuée et n'affecte qu'une partie réduite du cytoplasme polaire.

b) *Noyau:*

Dans les conditions expérimentales de notre étude, l'image radiographique du noyau, en fin de prophase I de méiose, est généralement claire.

La limite entre le cytoplasme environnant et la vésicule nucléaire est toujours très nettement dessinée. Chez certaines espèces, les microradiogrammes montrent une ligne absorbante continue, donnant l'image d'une membrane nucléaire. Lorsqu'elle n'est pas visible sous la forme d'une ligne matérielle, son tracé est toujours parfaitement défini par la frontière précise qui sépare les éléments figurés cytoplasmiques du contenu nucléaire. Nous savons qu'il existe autour du noyau une enveloppe à double paroi que la microscopie électronique met en évidence mais qui ne donne pas toujours une trace d'absorption en radiographie.

Par contre, dans tous les matériels, tous les types de noyaux observés permettent de constater que la caryolymphe présente une transparence remarquable au rayonnement qui se traduit, à la lumière du microscope, par un fond uniformément noir de l'image photographique.

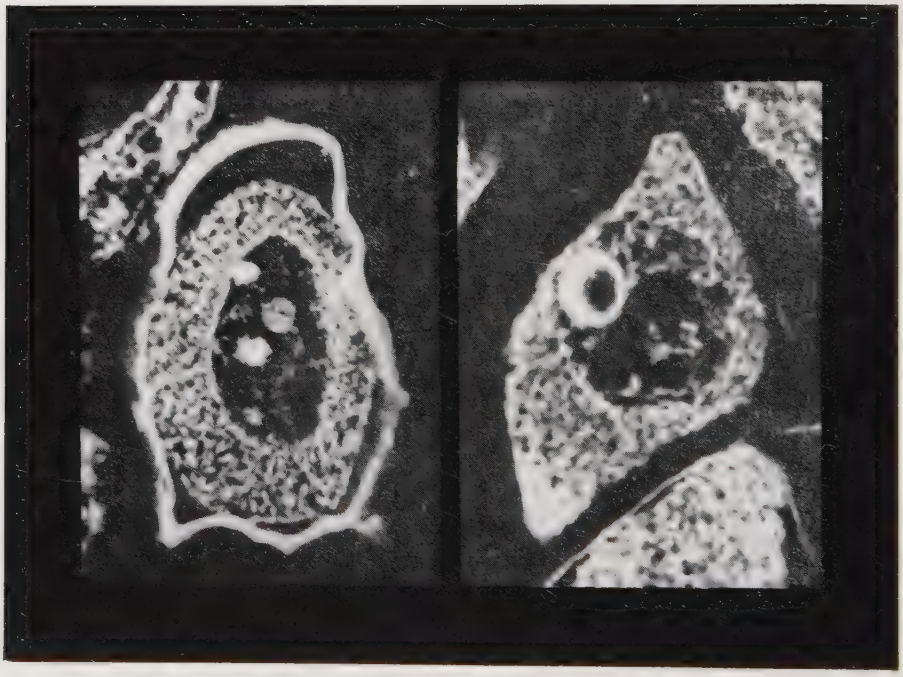


Figure 17. — (a) *Lilium* (× 1.000); (b) *Magnolia* (× 1.500).
Méiose. — Cellules-mères en prophase: masse vacuolisée du nucléole.

Le nucléole et les chromosomes sont les éléments absorbants présents dans le noyau. Le nucléole semble être la structure la plus opaque au rayonnement: son aspect est soit homogène, soit diversement vacuolisé (fig. 17). Les chromosomes apparaissent dès les stades les plus précoces de la pro-

phase comme des filaments fortement absorbants très nettement dessinés sur le fond transparent de la caryolymphe. Ils restent, durant tous les stades de la cinèse, massivement absorbants.

En fin de prophase, apparaissent d'autres éléments qui seront décrits ci-dessous.

Dans la période terminale de la prophase, les chromosomes, déjà très fortement condensés, montrent une tendance à se disposer à la périphérie du noyau (fig. 18a). A ce moment, leurs contours apparaissent moins nettement dessinés que précédemment. De leur surface s'écoule une substance qui se répand dans la caryolymphe en filets absorbants très fins (fig. 18b), dont le tracé sinueux et irrégulier ne révèle aucune orientation. On peut observer cet écoulement à partir de la surface du chromosome, sans localisation précise. Lorsque les masses chromatiques sont appliquées contre la paroi, on constate que la substance s'écoule et se répartit sur la face interne de la membrane nucléaire, ce que la coupe révèle par un tracé absorbant continu (fig. 18c). On peut observer souvent que cet écoulement traverse la membrane nucléaire et se dirige vers le pôle le plus proche en suivant l'orientation cytoplasmique décrite plus haut.

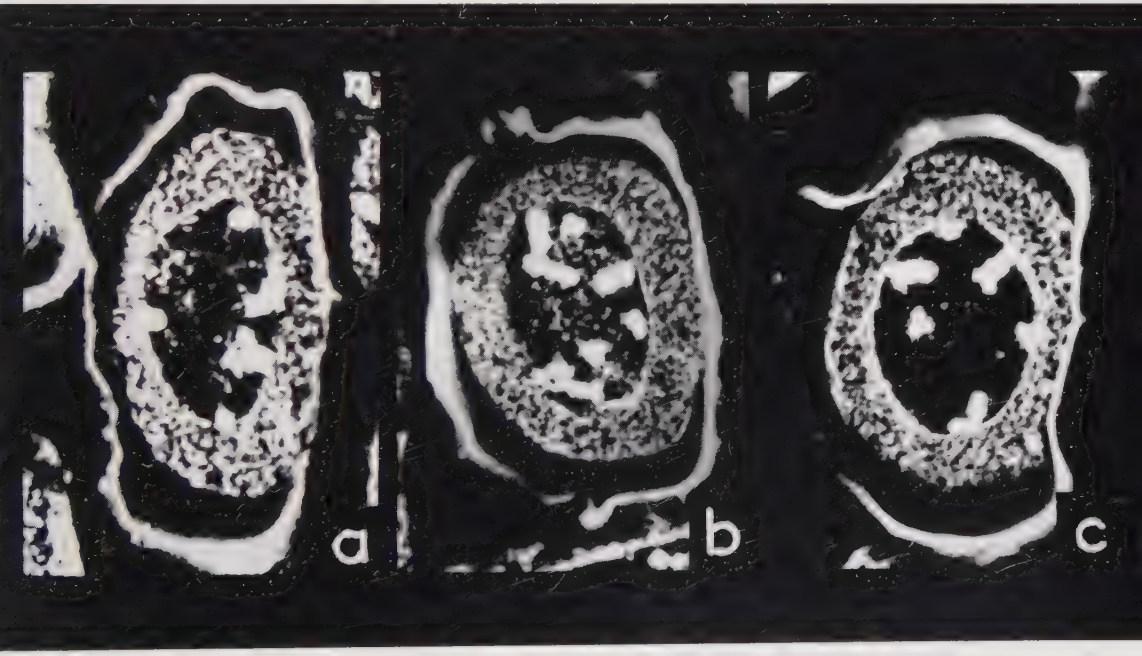
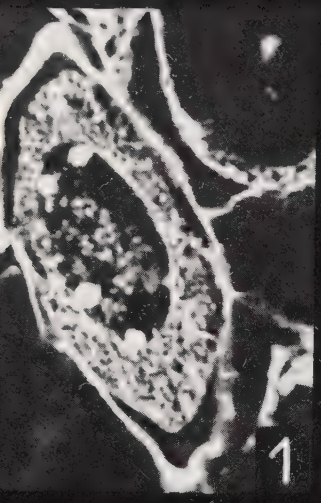
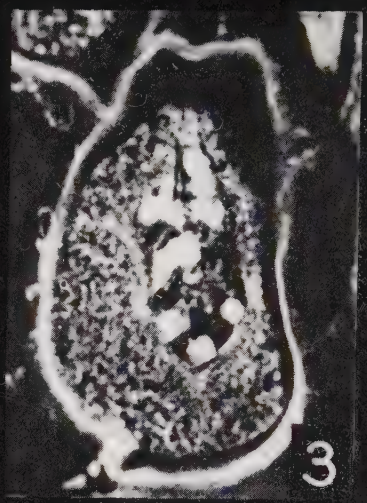
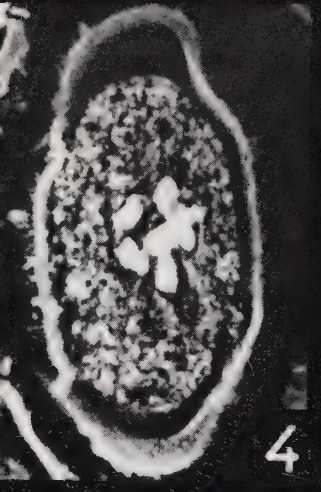


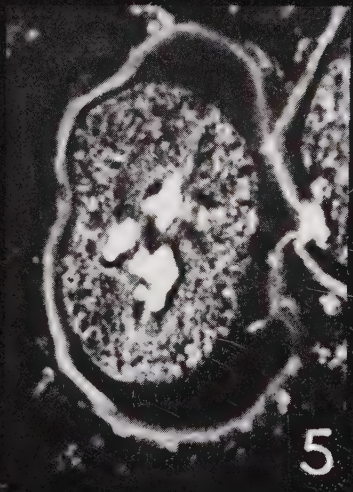
Figure 18. — Evolution du matériel absorbant en fin de prophase. (Méiose).
a et b: filets minces se répandant dans la cariolymphe à partir de la surface des chromosomes.
c: matière absorbante tapissant la face interne de la paroi nucléaire.
Cellules-mères de *Lilium candidum* (× 1.000).

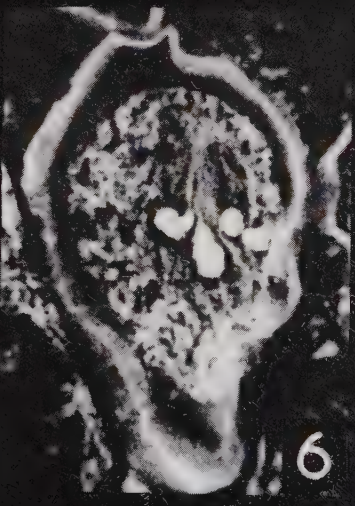

1

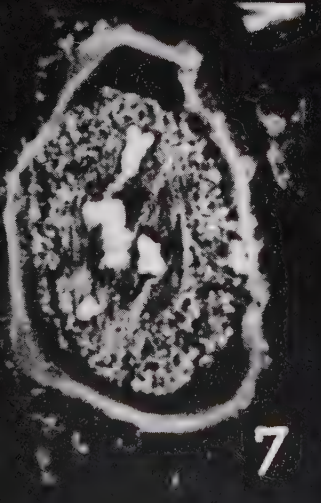
2

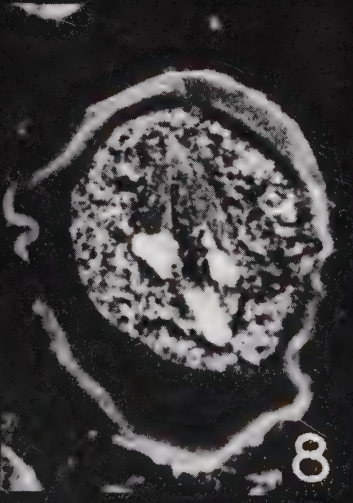

3

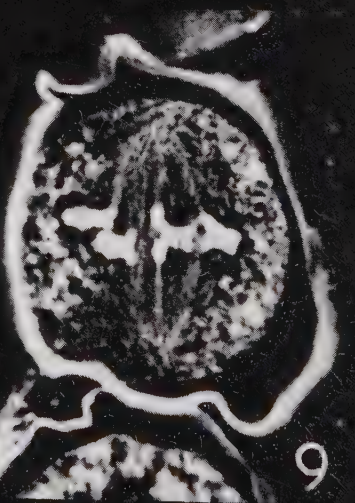

4


5


6


7


8


9

Dans un espace de temps très court, ont lieu des transformations profondes et rapides du contenu cellulaire qui aboutissent à l'édification progressive de l'appareil fusorial. Deux événements repérables marquent le début et la fin de cette courte évolution: la disparition de la membrane nucléaire et le déclenchement du mouvement anaphasique.

La disparition de la membrane nucléaire se manifeste sur l'image radiographique comme un effacement soudain de la frontière si précise qui existait dans la cellule entre le cytoplasme et le noyau (Pl. III, fig. 2, 3). Ce qui apparaît de manière très nette c'est la perte de l'individualité du noyau dans la cellule. D'un matériel à l'autre, on observe avec des intensités variables le phénomène qui aboutit à l'interpénétration des éléments de territoires jusqu'alors distincts. Nous l'avons observé à un degré très fort dans *Listera ovata*; dans *Lilium candidum* par contre, la «dilution» du cytoplasme paraît moins importante, ce qui est peut-être en relation avec le volume relativement plus grand qu'il occupe dans la cellule.

Du fait de la disparition de la membrane nucléaire, les chromosomes se trouvent irrégulièrement répartis. On peut observer alors la présence de matériel plus abondant et plus nettement orienté entre les pôles et les chromosomes; dans certains cas, des fibrilles très fines et très nombreuses sont visibles (Pl. III, fig. 5). D'autre part, on constate très souvent qu'à partir de la surface des chromosomes, encore disposés au hasard au centre de l'espace cellulaire, s'écoule un filet de substance absorbante relié par un tracé incertain et sinueux à l'un ou l'autre pôle (Pl. III, fig. 6, 7). L'aspect de cette substance rappelle fortement celle qui a été décrite en fin de prophase; les différences sont les suivantes: le filet est unique, beaucoup plus épais et relie un point précis du chromosome à l'un des pôles.

Ces connexions lâches s'esquissant entre chromosomes et pôles représentent les premières manifestations visibles des «fibres chromosomiques». Il n'est pas possible de dire à partir des seules données de la radiographie qu'il n'existe aucune autre connexion préexistante. On peut imaginer qu'un certain écoulement de substance se fait à partir du chromosome le long d'une fibre invisible en radiographie, qui relierait déjà le chromosome au pôle. Les images, à elles seules, suggèrent plutôt que la première connexion chromosome-pôle se fait effectivement par l'écoulement d'une substance présente semble-t-il à la surface du chromosome, ou produite par elle. Il faut noter aussi qu'au moment où la membrane nucléaire a disparu, le point de départ de cette connexion se trouve situé en un endroit précis du chromosome: le centromère.

Planche III. — Formation du fuseau de caryocinèse.
Lilium candidum. — Méiose, 1re division (× 1.000).

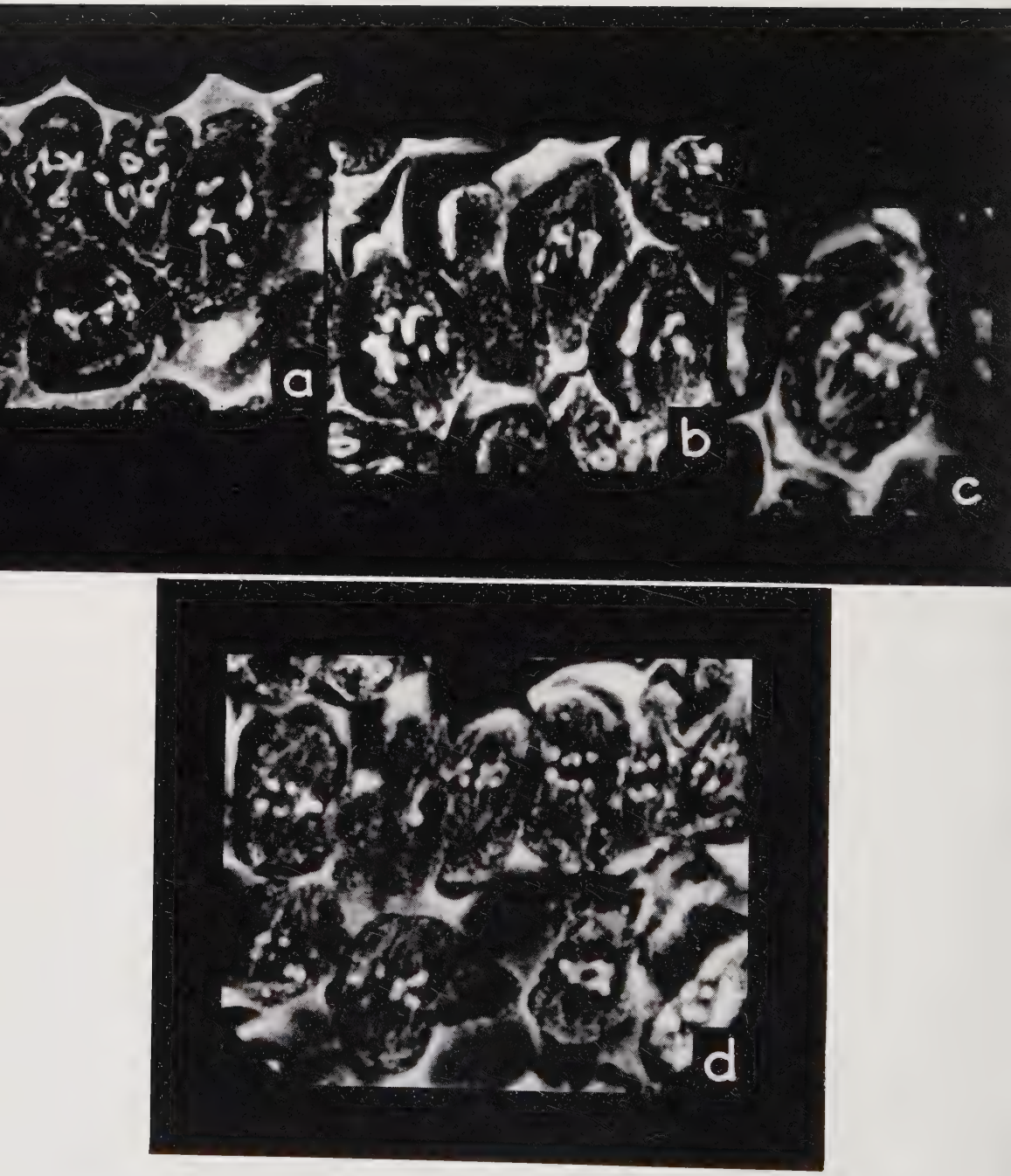


Figure 19. — *Listera ovata* (× 1.100). — Première division de méiose.
a, b, c: formation du fuseau de caryocinèse, avec individualisation des fibres et évolution morphologique des chromosomes.
d: séparation des chromosomes dans le mouvement anaphasique, raccourcissement des fibres.

Au moment où apparaissent les premières esquisses des fibres chromosomiques, ou peu de temps après, les images suggèrent clairement que les chromosomes, jusqu'ici disposés au hasard au centre de l'espace cellulaire, subissent l'action de forces s'exerçant à partir des pôles et tendant à leur faire effectuer des mouvements. L'amplitude et l'énergie de ces mouvements paraissent variables d'un matériel à l'autre. Nous les avons particulièrement bien observés dans *Listera ovata*, où le synchronisme presque absolu de l'évolution du processus cinétique dans les cellules-mères est précieux pour l'étude de stades aussi fugaces. L'impression de «mouvement» oscillant provient de la forme que présentent maintenant les chromosomes, étirés parallèlement à l'axe de polarisation et de leur distribution sur toute la distance qui sépare les deux pôles (fig. 19 a, b). Les images correspondent parfaitement à ce que l'on sait de ces mouvements par observation sur le vivant; ils sont clairement visibles sur les films cinématographiques, notamment ceux qui ont été réalisés sur la mitose par Bajer. Dans *Listera ovata*, la forme très étirée des chromosomes et leur parallélisme semblent être le signe d'une action énergique s'exerçant à partir des pôles. A ce stade de mouvement, les fibres reliant les chromosomes aux pôles sont toujours visibles, et paraissent maintenant tendues (fig. 19, b).

Il est important de noter à ce moment la longueur des chromosomes et leur forme étirée, par comparaison avec l'aspect très condensé qu'ils présentent aux stades ultérieurs *dans cette espèce Listera ovata* (fig. 19 c, d).

Les images suivantes montrent l'appareil cinétique constitué sous la forme classique d'un fuseau de métaphase sur lequel sont insérés les chromosomes en une plaque équatoriale bien ordonnée. Les caractères de ce fuseau qui apparaissent avec généralité sont les suivants:

1° Chaque chromosome est relié individuellement au pôle par une structure absorbante continue qu'on peut appeler «fibre chromosomique».

2° Ces fibres chromosomiques convergent en un point précis.

3° Les fibres sont très régulièrement arquées; le rayon de courbure de chacune d'elles varie avec la position plus ou moins centrale de son chromosome sur la plaque équatoriale.

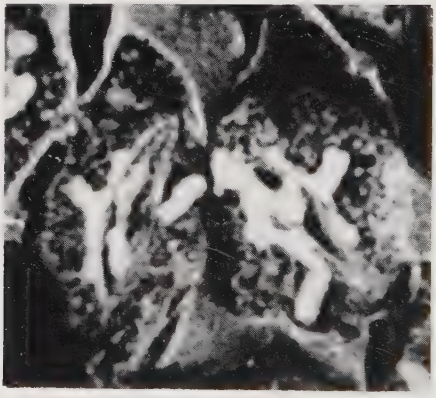
4° L'absorption des fibres est toujours forte, bien que variable d'un matériel à l'autre.

5° L'espace occupé par le fuseau apparaît libre de toute inclusion cytoplasmique. Le milieu qui se trouve entre les fibres chromosomiques est en général transparent au rayonnement. Du matériel, discrètement

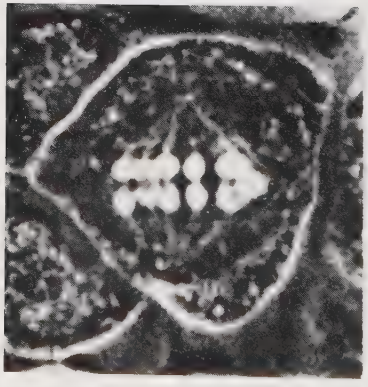
Lilium (M. I)
(× 1.000.)

Magnolia (M. I)
(× 1.400.)

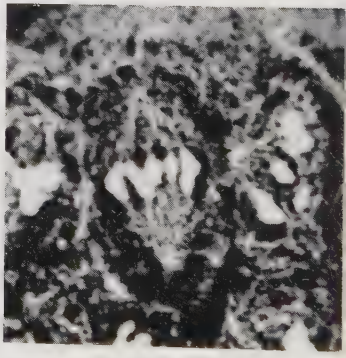
Allium (mitose)
(× 1.600.)



Paeonia (M. I)
(× 1.400.)



Listera (M. I)
(× 1.400.)



Locusta (M. I)
(× 1.500.)

Figure 20. — Fuseau de caryocinèse en métaphase avec fibres individualisées.
Position axiale et forme générale du fuseau; convergence des fibres chromosomiques en un point

absorbant et orienté parallèlement aux fibres, est visible dans certaines coupes, surtout vers les régions polaires (Pl. III, fig. 9).

6° Aucune structure continue comparable aux fibres chromosomiques n'est visible en radiographie, reliant directement les deux pôles du fuseau.

Evolution de l'appareil cinétique en anaphase.

Lorsque le fuseau est constitué, la cellule paraît avoir atteint un équilibre qui s'exprime dans la symétrie de la figure de métaphase. Le déclenchement de l'anaphase introduit une phase nouvelle particulièrement active. La radiographie nous permet d'en reconnaître certains aspects concernant l'évolution de l'appareil fusorial et les remaniements de la masse cytoplasmique en relation avec le mouvement des chromosomes.

La séparation des deux groupes de chromosomes et leur migration synchrone vers leurs pôles respectifs s'accompagne d'une évolution particulière de l'appareil fusorial, observée aussi bien en méiose qu'en mitose, dans l'ensemble du matériel prospecté.

La progression de chaque chromosome vers son pôle s'accompagne d'un raccourcissement de la fibre individuelle qui l'y rattache (fig. 19, d). Lorsque le chromosome a quitté le plan équatorial en se séparant de son homologue, il reste relié au pôle par un tractus absorbant comme en métaphase. Durant tout le trajet du plan équatorial au pôle, le chromosome paraît ainsi attaché par le centromère à l'extrémité de sa fibre, comme à un filament qui se raccourcirait au fur et à mesure de sa progression vers le pôle. La comparaison avec un fil est suggérée par l'aspect rectiligne, tendu, de la structure absorbante et qui contraste avec la courbure très régulière qu'elle présentait dans le fuseau de métaphase.

Le raccourcissement de la fibre chromosomique se fait sans aucun épaississement visible en radiographie. Il ne semble pas non plus que son absorption ait augmenté; à l'observation, elle est plutôt moins absorbante en anaphase qu'en métaphase.

Au moment où les deux groupes chromosomiques ont terminé leur trajet, aux abords des pôles opposés, le fuseau de caryocinèse n'est plus visible dans la cellule, chacune des fibres chromosomiques ayant disparu avec la progression de chaque chromosome.

Pendant le mouvement anaphasique, l'espace qui s'étend entre les deux groupes symétriques de chromosomes présente les aspects successifs d'une évolution qui paraît très générale.

Figure 21. — *Listera ovata* (× 1.500). — Evolution du cytoplasme.

a b: anaphase et télophase: apparition progressive, entre les groupes polaires, de matériel absorbant uniformément orienté.

c: Fuseau de métaphase II avec fibre individuelle des chromosomes; fond de cytoplasme non orienté.

Figure 22. — *Listera ovata.* — Cloisonnement du cytoplasme de la cellule-mère après la 2e division de méiose (× 1.500).

Immédiatement après la séparation des chromosomes dans le plan équatorial et jusqu'à ce qu'ils aient parcouru environ un tiers de leur trajet en direction des pôles, l'espace médian reste très transparent et paraît libre de toute inclusion. Dans certaines espèces (*Lilium*), cette région peut présenter des éléments fibrillaires très discrètement absorbants. Dans tous les cas cependant, le territoire situé entre les deux groupes chromosomiques qui viennent de se séparer est toujours le moins absorbant de toute la cellule. Lorsqu'augmente la distance entre les deux groupes anaphasiques, des éléments figurés absorbants, d'origine semble-t-il cytoplasmique, y apparaissent progressivement. Pendant un certain temps, ils sont orientés au hasard; mais vers la fin de la migration anaphasique, ils présentent une orientation très nettement parallèle à l'axe de division. Lorsque les deux groupes de chromosomes ont atteint les pôles et commencé leur évolution télophasique, la masse du cytoplasme encore indivise remplit assez uniformément l'ensemble du territoire cellulaire (fig. 21, a, b), dans le cas où une cytocinèse ne suit pas immédiatement.

En méiose, l'orientation apparue au cours de l'anaphase dans la région axiale s'est généralement étendue à toute la masse cytoplasmique lorsque les deux jeunes noyaux constitués apparaissent sous forme de vésicules clairement délimitées. Les éléments figurés cytoplasmiques sont orientés selon des lignes qui semblent joindre un noyau à l'autre en touchant orthogonalement la surface de chacun d'eux. Parallèles entre elles dans la région centrale, elles s'incurvent progressivement du côté extérieur, de sorte que l'ensemble du cytoplasme prend l'aspect d'un «tonnelet» (fig. 23). En mitose, le cytoplasme n'est pas orienté dans sa totalité.

Lorsqu'en première division de méiose, la division du cytoplasme ne suit pas immédiatement la cinèse I (*Listera, Paeonia*), cette orientation disparaît de nouveau. Les deux fuseaux de caryocinèse II apparaissent dans un territoire cytoplasmique unique où toute orientation en rapport avec la première division a disparu.

Lorsque la cytocinèse suit immédiatement la caryocinèse — en mitose, ou cinèse I de Liliacées —, cette orientation du cytoplasme en fin d'anaphase ne peut pas être dissociée des nouvelles structures qui apparaissent dans la cellule en rapport avec la cytocinèse.

Figure 23. — *Paeonia arborea.* — Cytoplasme orienté dans l'ensemble de la cellule entre les groupes télophasiques (× 1.600).

II. — CYTOCINESE.

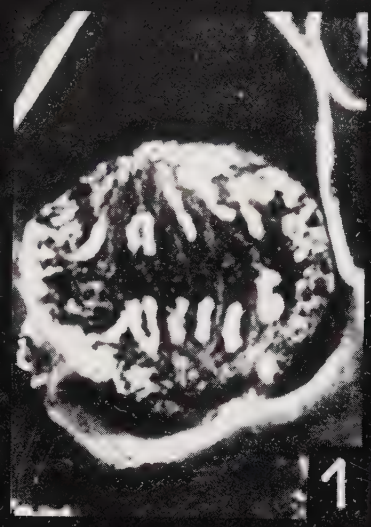
La division du noyau n'est pleinement réalisée que lorsque les deux groupes de chromosomes arrivés aux pôles ont évolué en deux noyaux parfaitement constitués. L'individualisation du noyau se fait en télophase. Elle est liée à l'apparition d'une frontière précise entre le cytoplasme et la caryolymphe. La division du cytoplasme ou cytocinèse fait normalement suite à la division du noyau et les mécanismes qu'elle met en jeu paraissent alors plus ou moins imbriqués avec ceux de la caryocinèse. Rappelons qu'elles peuvent être dissociées l'une de l'autre dans le temps: caryocinèses successives sans cloisonnements aboutissant à un syncytium (c'est le cas de l'albumen), divisions de méiose dans les espèces du plus grand nombre de Dicotylédones où le cloisonnement n'intervient qu'après la formation des quatre noyaux de la tétrade présents dans une masse cytoplasmique commune. Dans chacun de ces cas, la division du cytoplasme s'effectue apparemment sans relation immédiate avec une division nucléaire.

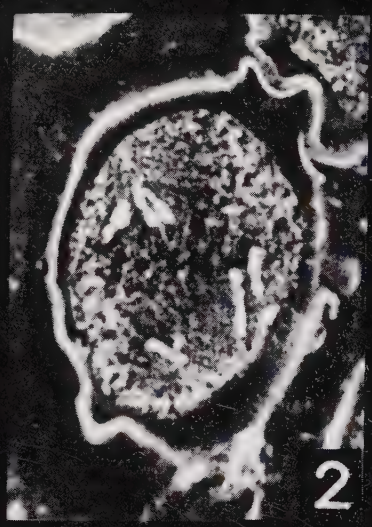
Dans les cellules végétales que nous avons étudiées, la cytocinèse se réalise selon un processus constant dont les images en microradiographie montrent deux étapes essentielles:

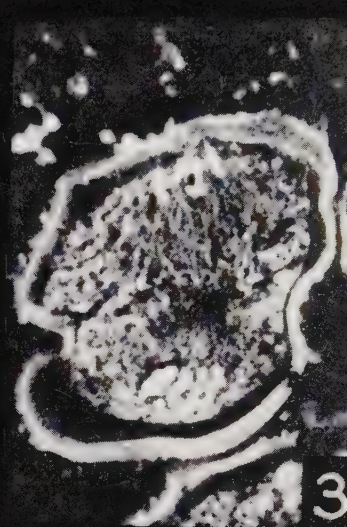
1. l'établissement d'une orientation dans le cytoplasme indivis conduisant à une sorte de nouvel appareil fusorial de structure fibreuse, différent de celui de caryocinèse;

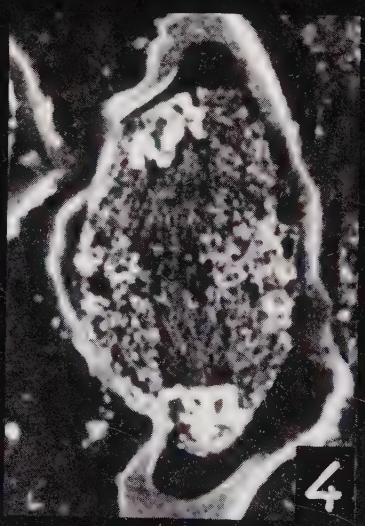
2. la construction progressive d'une cloison perpendiculaire aux fibres de ce fuseau et coïncidant avec son plan équatorial.

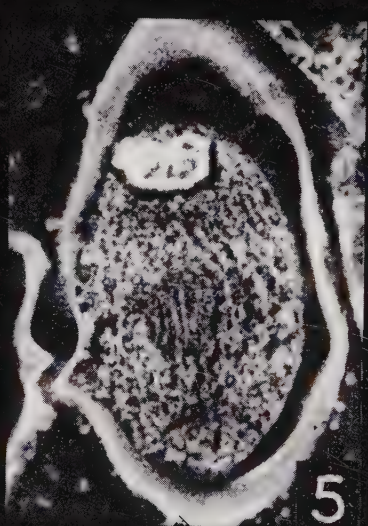
Ces deux phénomènes, liés à la division du cytoplasme, ont été retrouvés partout dans le matériel prospecté, aussi bien lorsque la cytocinèse suit immédiatement la caryocinèse que lorsqu'elle est différée. Cependant, le déroulement du processus a pu être suivi plus en détail au cours des deux divisions de méïose du genre *Lilium*, où caryocinèse et cytocinèse se suivent sans discontinuité. La description qui suit se rapporte à ce matériel.

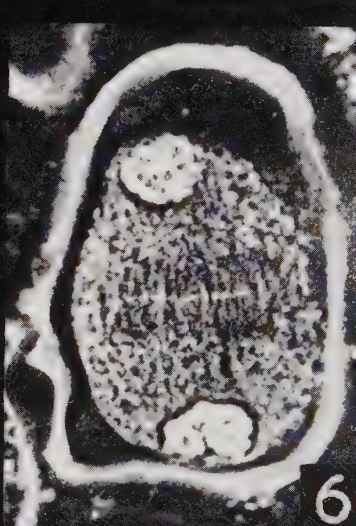

1

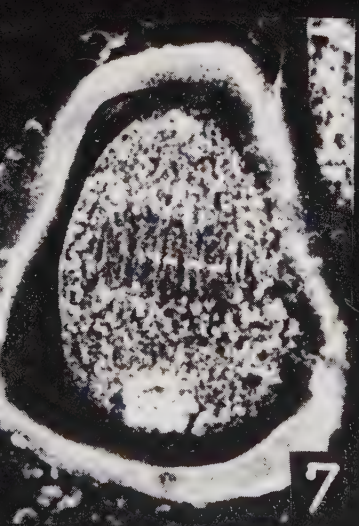

2

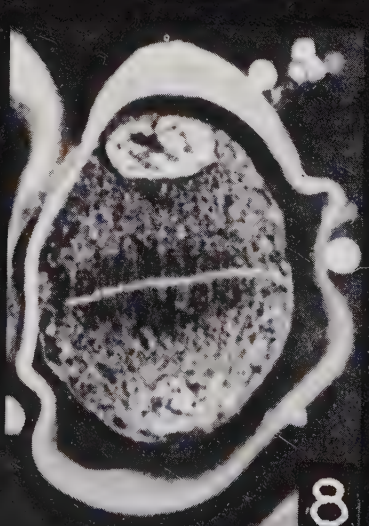

3

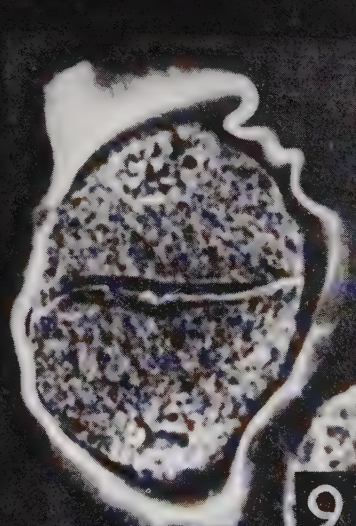

4


5


6


7


8


9

Etablissement du «fuseau de cytocinèse» dans Lilium.

Lorsque les chromosomes ont atteint les pôles en fin d'anaphase, le fuseau de caryocinèse, formé essentiellement des fibres chromosomiques individuelles, a complètement disparu. La région axiale qu'il avait occupée a été envahie, surtout dans sa zone équatoriale, par des éléments cytoplasmiques assez rares, ne paraissant pas orientés. Elle est donc encore reconnaissable dans la cellule, comme une région d'absorption plus faible.

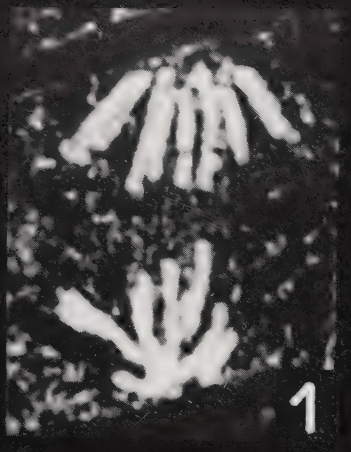
Vers la fin du mouvement anaphasique, apparaissent des fibrilles rectilignes très fines, qui se développent à partir des deux régions polaires vers l'équateur (Pl. IV, fig. 2).

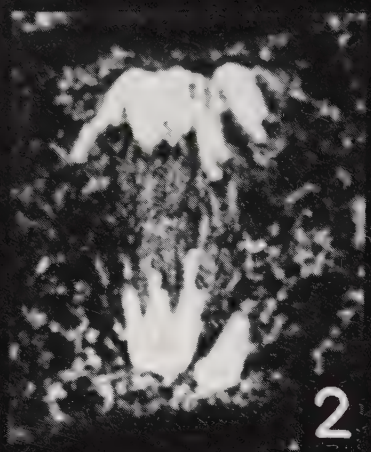
Plus tard, ces fibrilles apparaissent très nombreuses et très serrées à partir des abords immédiats des chomosomes télophasiques, puis de la membrane nucléaire du jeune noyau sur toute sa surface externe et en position orthogonale. Dans la région axiale, pauvre en inclusions, le faisceau paraît plus serré. Son développement semble refouler des éléments cytoplasmiques absorbants vers la zone équatoriale. On constate ainsi une véritable accumulation de ces inclusions sur un anneau périphérique ceinturant la région équatoriale (Pl. IV, fig. 3, 4).

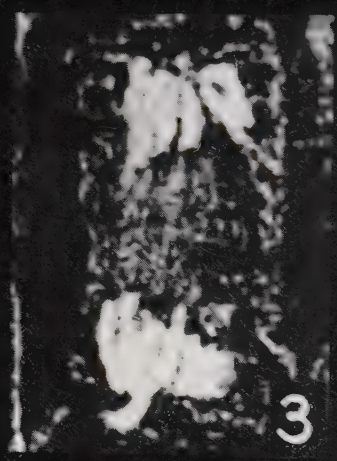
Ces deux faisceaux divergents de fibrilles issues des pôles opposés, se rencontrent dans le plan de l'équateur tout d'abord dans la région axiale. Dans le plan de contact, des connexions s'établissent de plus en plus nombreuses et s'étendent progressivement du centre vers la périphérie. Il se constitue ainsi un appareil fusorial unique dont les fibrilles paraissent relier sans discontinuité un noyau à l'autre en traversant l'ensemble du territoire cytoplasmique (Pl. IV, fig. 5).

Pendant que les jonctions se réalisent, du centre du fuseau vers la périphérie, apparaît une distribution du matériel cytoplasmique en deux zones symétriques par rapport au plan équatorial. Chacun des deux domaines cytoplasmiques réserve un territoire de forme lenticulaire, en position équatoriale, qui reste libre de toute inclusion, et dans lequel persistent avec netteté de très nombreuses fibrilles fusoriales. La continuité des fibres entre les deux noyaux est alors difficile à suivre à travers les deux masses cytoplasmiques situées de part et d'autre.

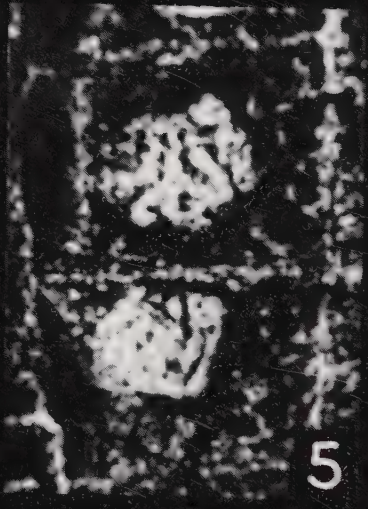
Lilium candidum — Méiose, 1re division (× 1.000).
Planche IV. — Etapes de cytocinèse.


1

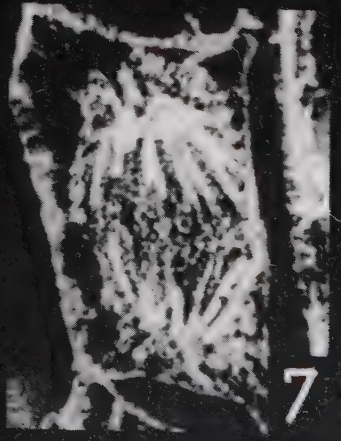

2


3

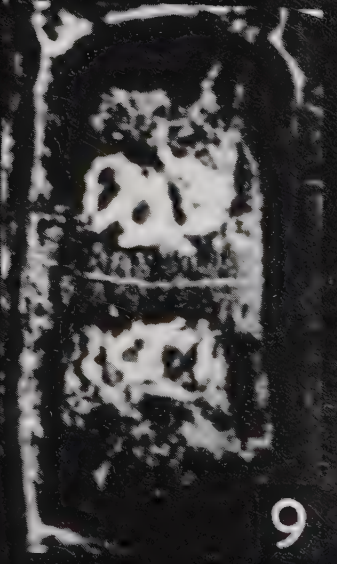
4


5

6


7

8


9

Edification de la cloison.

Lorsque la zone lenticulaire équatoriale s'est formée, la division du cytoplasme en deux territoires distincts est déjà virtuellement réalisée. L'édification d'une cloison matérielle rend cette division irréversible et sépare définitivement deux nouvelles cellules devenues autonomes.

La microradiographie permet de suivre les étapes de la construction de cette cloison.

Sur les fibrilles très fines et parallèles de la zone équatoriale, on voit apparaître des épaississements ponctiformes très absorbants au niveau du plan (Pl. IV, fig. 6, 7). En coupe, apparaît une ligne de points qui fusionnent par deux ou par plusieurs et qui, peu à peu, se soudent en une ligne continue. Ce processus s'étend progressivement du centre vers la périphérie du plan équatorial jusqu'à la paroi de la cellule primitive. A ce moment, une cloison plane, continue, sépare les deux jeunes cellules nouvellement formées (Pl. IV, fig. 7, 8).

Au contact de cette nouvelle cloison, il se forme rapidement une membrane cytoplasmique comme le montrent les décollements du cytoplasme qui apparaissent alors fréquemment sur les sections (Pl. IV, fig. 9). A ce stade, la fibrillation qui avait persisté de part et d'autre pendant un certain temps a complétement disparu; il en est de même de l'orientation des éléments figurés au sein des deux masses cytoplasmiques.

La cytocinèse des divisions somatiques. (Pl. V.)

Au cours des divisions somatiques que nous avons étudiées dans les méristèmes radiculaires d'*Allium*, de *Nothoscordon*, de *Hyacinthus*, de *Tulipa*, la cytocinèse se réalise toujours comme dans *Lilium* au cours de la méiose, après édification d'un appareil fusorial différent de celui de caryocinèse. Les fibres chromosomiques individuelles, nous l'avons vu, disparaissent avec la progression des chomosomes en anaphase. Au début de la séparation des deux groupes, l'espace intermédiaire apparaît peu absorbant et le matériel cytoplasmique qui y devient visible n'est pas orienté. Vers la fin de l'anaphase, apparaît progressivement dans l'axe de l'ancien fuseau une structure fibreuse absorbante qui s'étend entre les deux groupes de chromosomes. Elle prend rapidement un aspect fusorial: les fibrilles parallèles, très longues et très serrées, s'incurvent progressivement vers l'extérieur. Ses

Planche V. — Mitose somatique — Cytocinèse.
1 — 6: *Nothoscordon inodorum*
7 — 9: *Hyacinthus orientalis*
(× 1.600).

bords se détachent avec netteté de la masse de cytoplasme cellulaire non orienté et moins absorbant.

L'apparition de la cloison se fait de la même manière que dans *Lilium:* la fusion d'épaississements ponctiformes, apparus sur les fibres au niveau du plan équatorial. Les fibrilles disparaissent dès qu'un segment de la cloison est formé dans la région axiale. La cloison s'édifie ainsi, dans une progression centrifuge, jusqu'aux parois de la cellule primitive.

D - ANALYSE DES RÉSULTATS.

La radiographie de cellules engagées dans le processus de division nous montre des transformations structurales qui ont lieu au niveau des éléments non colorables en rapport étroit avec les transformations et les mouvements du matériel chromatique.

Afin d'obtenir confirmation de la réalité des structures auxquelles correspondent les images de radiogramme, notre objet sera maintenant de les confronter avec les observations recueillies par d'autres méthodes. Nous verrons ensuite dans la discussion ce qu'apportent ces informations à la compréhension de quelques-uns des mécanismes complexes mis en jeu au cours de la division cellulaire.

I. — CARYOCINESE.

En ce qui concerne l'édification de l'appareil cinétique, les observations répétées de microradiographies suggèrent que les fibres chromosomiques constituant l'architecture principale du fuseau s'édifient progressivement par l'interaction de deux éléments:

— des centres organisateurs, présents dans le cytoplasme, devenant actifs avant la disparition de la membrane nucléaire;

— une substance émise par chaque chromosome qui subit l'action «polarisante» directe du centre, après disparition de la membrane nucléaire.

Les centres organisateurs.

L'observation d'«asters» révèle qu'il existe des centres organisateurs du fuseau dans le cytoplasme de cellules de plantes supérieures. En cytologie descriptive, des centres sont décrits comme des organites, formés à partir du centrosome (ainsi appelé parce que capable de se diviser). Durant la caryocinèse, ils s'entourent d'une couronne de stries rayonnantes plus ou moins développées, qui forment les «asters». La position des deux centrosomes-fils dans le cytoplasme en fin de prophase détermine l'orientation du fuseau.

Les images de microradiographie, d'une part montrent des structures rayonnantes avec, dans certains cas favorables, un granule central correspondant au centriole défini par Boveri, d'autre part elles font apparaître le rôle de ces centres dans l'édification de l'appareil cinétique: induction d'orientation au niveau du cytoplasme avant la fin de la prophase, organisation du fuseau après disparition de la membrane nucléaire.

La radiographie en a montré dans toutes les espèces observées appartenant à divers groupes de *Dicotylédones:* Ranales, Rosales, Composées, aussi bien que de *Monocotylédones:* Liliacées, Amaryllidacées, Orchidées.

Le fait mérite une attention spéciale parce qu'il s'agit de Plantes à fleurs. Dans les cellules végétales, l'existence de centres mitotiques a suscité des controverses. Chez les Algues, les Champignons, les Prêles et les Fougères, les Mousses et les Hépatiques, des centres ont été décrits avec de belles images de radiations astériennes. Dès 1898, les Thallophytes aussi bien que les cellules animales sont considérées comme équipées de centres cinétiques. Les observations ont souvent porté sur la division qui donne naissance à des cellules destinées à développer un appareil flagellaire — les anthérozoïdes —, qu'il apparaisse ou non un blépharoplaste en relation avec les centres. C'est seulement au cours de la gamétogénèse mâle qu'ont été faites les observations chez *Ginkgo, Cycas,* pour les Gymnospermes. Dans les Angiospermes, par contre, l'existence de centres n'a jamais été reconnue, bien que des cytologistes, depuis la fin du siècle dernier en aient décrit (Guignard, 1891, Mottier, 1892, Calkins, 1897).

Pourtant, l'existence de structures orientées en prophase dans le cytoplasme a fait l'objet d'observations dans les cellules de plantes supérieures.

Devisé (1922), dans *Larix europaea,* constate l'existence de formations fibreuses à l'extérieur du noyau en fin de prophase; il les considère comme étant de nature mitochondriale et pense qu'elles ne prennent pas part à la formation du fuseau. Bowen (1928) décrit, dans *Ricinus,* autour des futurs pôles, un arrangement radiaire d'éléments allongés du cytoplasme. L'existence de «calottes polaires» en fin de prophase avait été observée antérieurement et mise en relation avec l'édification du fuseau (Robyns, 1924, Belar, 1929, Schneider, 1933). Des observations nombreuses ont été faites plus récemment relatives à une «zone claire» apparaissant en fin de prophase près du noyau: Bajer (1957), Longwell et Mota (1960). Elle a été interprétée par Bajer comme le premier signe de l'assemblage du fuseau. La microscopie polarisante montre que cette «zone claire», dépourvue d'inclusions cytoplasmiques, est formée de matériel fortement orienté entre les pôles et la membrane nucléaire (Inoué et Bajer, dans The Cell III, p. 201, 1961).

Formation de la fibre chromosomique.

La radiographie nous a montré l'existence d'une substance absorbante s'écoulant de la surface du chromosome en fin de prophase et semblant contribuer à la formation de sa fibre individuelle.

Peu d'observations sont rapportées à ce sujet en cytologie descriptive. Cependant Sharp, dans son manuel (1943), fait état de l'apparition d'une petite masse de matériel qui, progressivement, s'étend vers les pôles en prenant l'aspect d'une fibre: l'hypothèse d'un fluide secrété par la chromatide est clairement formulée. Le fait que cette substance contient parfois du matériel Feulgen-positif est considéré comme un argument en faveur de son origine chromosomique. Wada (1950), se basant sur les résultats d'expériences sur les cellules vivantes, émet l'hypothèse d'une diffusion de substance, du centromère en direction des pôles, pour expliquer la formation d'une connexion chromosome-pôle.

On peut rapprocher de ces observations les changements chimiques signalés au niveau des chromosomes dans un certain nombre de travaux récents. Il s'agit d'un dépôt d'ARN à la surface des chromatides au cours de la prophase, et de l'absence de cet ARN périphérique sur la matrix en anaphase et télophase. Serra (1947) parle de «dépôt de nucléoprotéines». Kaufmann (1948) l'a observé dans la racine d'Allium, Webb (1952) et Boss (1954) dans les cellules animales, Pelling (1959), Goldstein et Micou (1959) pensent à une synthèse d'ARN au niveau des chromosomes. Jacobson et Webb (1952) sont d'avis que l'ARN qui apparaît en fin de prophase se dépose en grains sur la surface des chromatides avant l'érosion du nucléole. Brown (1954) suggère que cet ARN chromosomique dérive du nucléole. Kaufmann et Das (1955) ont montré l'importance de la présence d'ARN pour le bon fonctionnement du fuseau; la ribonucléase crée des anomalies mitotiques. D'autre part, Lacour et Chayen (1958) constatent une colorabilité par l'«Orange G» des régions euchromatiques des chromosomes, qui apparaît en fin de prophase. Cette observation se superpose à celle des auteurs précédents, mais indiquerait la présence de phospholipides au contact des chromosomes.

Mazia, en présentant les travaux cités (1961, The Cell, III) attribue une grande importance à ces changements chimiques constatés au niveau de la surface du chromosome; il réserve aux résultats futurs la possibilité de mettre en rapport ces faits avec une «participation du chromosome à la formation de l'appareil mitotique».

Nous constatons que les changements chimiques décrits coïncident dans le temps et dans l'espace avec l'observation en microradiographie d'une substance absorbante, qui a tendance à s'écouler de toute la surface du chromosome. De plus, l'ARN aussi bien que les composés phospholipidiques dont il est question dans les travaux cités, sont également caractérisés par une forte absorption des rayons X. La microradiographie permet de suivre

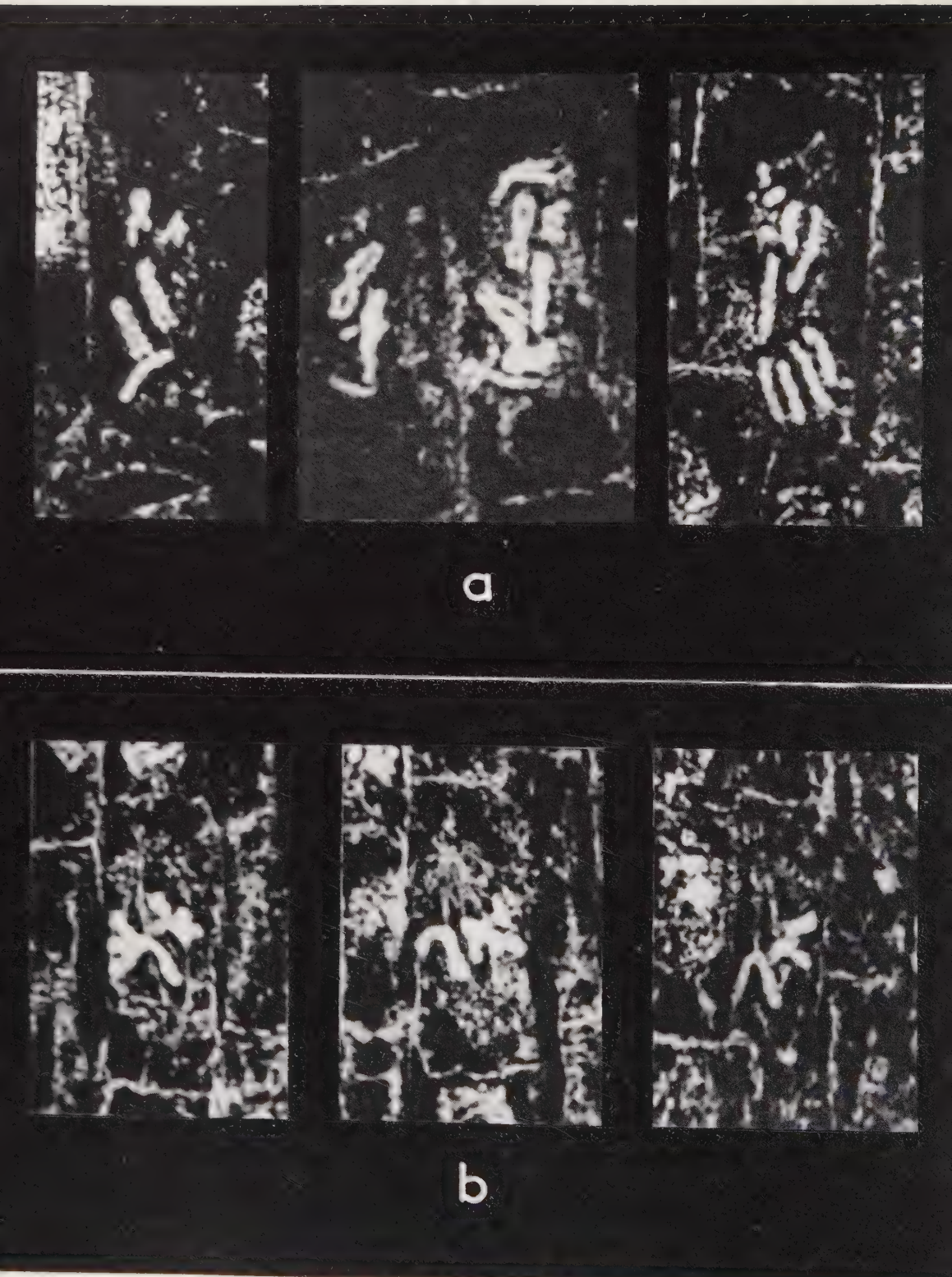


Figure 24. — *Allium cepa.*
a) chromosomes après action de la Colchicine (0,1%)
b) chromosomes avec leur fibre dans le matériel normal
(× 1.650).

l'évolution ultérieure du matériel et de le voir incorporé à la fibre chromosomique. Les changements chimiques constatés dans la zone périphérique du chromosome prennent, de ce fait, une signification précise.

Les constatations de Richards et Bajer (1961), en microscopie interférentielle, d'une diminution importante de la masse totale du noyau peu de temps avant la rupture de la membrane nucléaire, pourraient être rapprochées de nos observations. Nous avons vu en effet que le matériel exsudé peut se répandre sur la face interne de la membrane nucléaire, et aussi, très souvent, la traverser pour se diriger vers un pôle. D'autre part, Caspersson (1940) a montré, par l'évolution du spectre d'absorption d'ultraviolet, que de l'acide nucléique est libéré des chromosomes pendant la prophase.

L'action de la Colchicine a été utilisée dans l'intention d'agir expérimentalement sur la formation du fuseau de caryocinèse. Le processus était le suivant: des bulbes d'*Allium cepa,* cultivés sur l'eau, ont été plongés durant 12 heures dans une solution de Colchicine à 0,01% puis les pointes de racines ont été fixées. Les microradiographies faites sur des coupes du méristème terminal montrent des cellules en «métaphase-C» et «anaphase-C» (fig. 24a).

Les images révèlent d'une part l'absence complète de fibres chromosomiques et d'autre part une altération très importante de l'enveloppe du chromosome. Celle-ci est transparente au rayonnement, si bien que l'image radiographique est plus proche de celle d'un chromonema hélicoïdal que d'un chromosome métaphasique. La différence est frappante entre l'image d'un chromosome colchiciné et celle d'un chromosome normal qui se révèle toujours massivement absorbant dans les autres observations (fig. 24b). On peut toujours remarquer l'absence simultanée de l'enveloppe absorbante et de la fibre.

Dans certaines cellules en «métaphase-C», des centres actifs organisateurs du fuseau apparaissent pourtant comme des structures rayonnantes dans les régions polaires (fig. 25).

Figure 25. — *Allium sp.* — Mitose C. Chromosomes «squelettisés» dispersés; absence de fibre individuelle, mais présence de structure rayonnante dans la région polaire.

Il semble donc que la formation d'une fibre et son fonctionnement normal ne puissent se réaliser si l'enveloppe chromatique est altérée. Nous pouvons trouver là une confirmation de ce que nous montre la microradiographie des caryocinèses déjà observées: le chromosome participe à la formation de sa fibre, donc à l'élaboration de l'appareil cinétique.

Les mouvements prémétaphasiques.

Les observations, faites au moyen des radiographies, peuvent être mises en relation avec les mouvements des chromosomes, si bien observés sur le vivant. La formation de la première connexion entre chaque chromosome et l'un des pôles, telle que nous l'avons décrite, semble se réaliser avant tout mouvement du chromosome. Non seulement la fibre, comme tractus absorbant, devient une réalité objective, mais sa formation annonce les mouvements.

Les premiers mouvements qu'exécutent les chromosomes, en relation avec les pôles, sont visibles et ont été décrits peu après la disparition de la membrane nucléaire. Ils se terminent lorsque les chromosomes sont disposés en figure de métaphase. Flemming (1879) avait déjà reconnu leurs aspects essentiels, qui ont été confirmés par les analyses plus récentes: Schneider (1943), Schrader (1947), Hughes-Schrader (1947), Bajer (1954 et 1956), Zirkle (1957).

Les caractères généraux de ces mouvements sont les suivants:

1° Ce sont des mouvements de va et vient entre les deux pôles, parallèlement à l'axe du fuseau.

2° Chaque chromosome migre individuellement: deux chromosomes voisins peuvent se déplacer en sens opposé dans une même moitié du fuseau.

3° Le premier mouvement d'un chromosome semble être de se rapprocher d'un pôle: il se dirige ensuite vers l'équateur qu'il peut parfois dépasser, mais il y retourne toujours.

Les images de radiographie suggèrent que le mouvement de va et vient qu'exécutent les chromosomes en prométaphase est dû à une traction exercée alternativement sur l'un et l'autre centromère, à partir de l'un et l'autre pôle. L'analogie de ces mouvements avec le mouvement anaphasique a toujours été soulignée, et récemment encore par Bajer et Mole-Bajer (1956) qui en ont fait une description minutieuse à l'aide de méthodes cinématographiques dans les divisions de l'albumen de différentes Liliacées. Ces auteurs observent, comme d'autres avant eux (Schneider 1933, Schrader

1947, Dietz 1956), que le premier déplacement d'un chromosome se fait en direction d'un pôle, parcourant ainsi une distance qui peut être considérable. Ils constatent en outre que la vitesse de ce premier déplacement est deux ou trois fois plus grande que la vitesse de son mouvement de retour vers l'équateur (dans *Clivia:* 1 μ/min. contre 0,3 μ/min.). Dietz observe des différences de vitesse analogues dans *Tipula lateralis* (1956). Ces observations paraissent bien s'accorder avec ce que suggère la radiographie: l'établissement d'une liaison avec d'abord l'un des pôles, suivie immédiatement d'une traction du chromosome. Le mouvement de retour vers l'équateur ne peut se faire qu'après l'établissement de la connexion avec le pôle opposé et par la traction exercée alors en sens inverse.

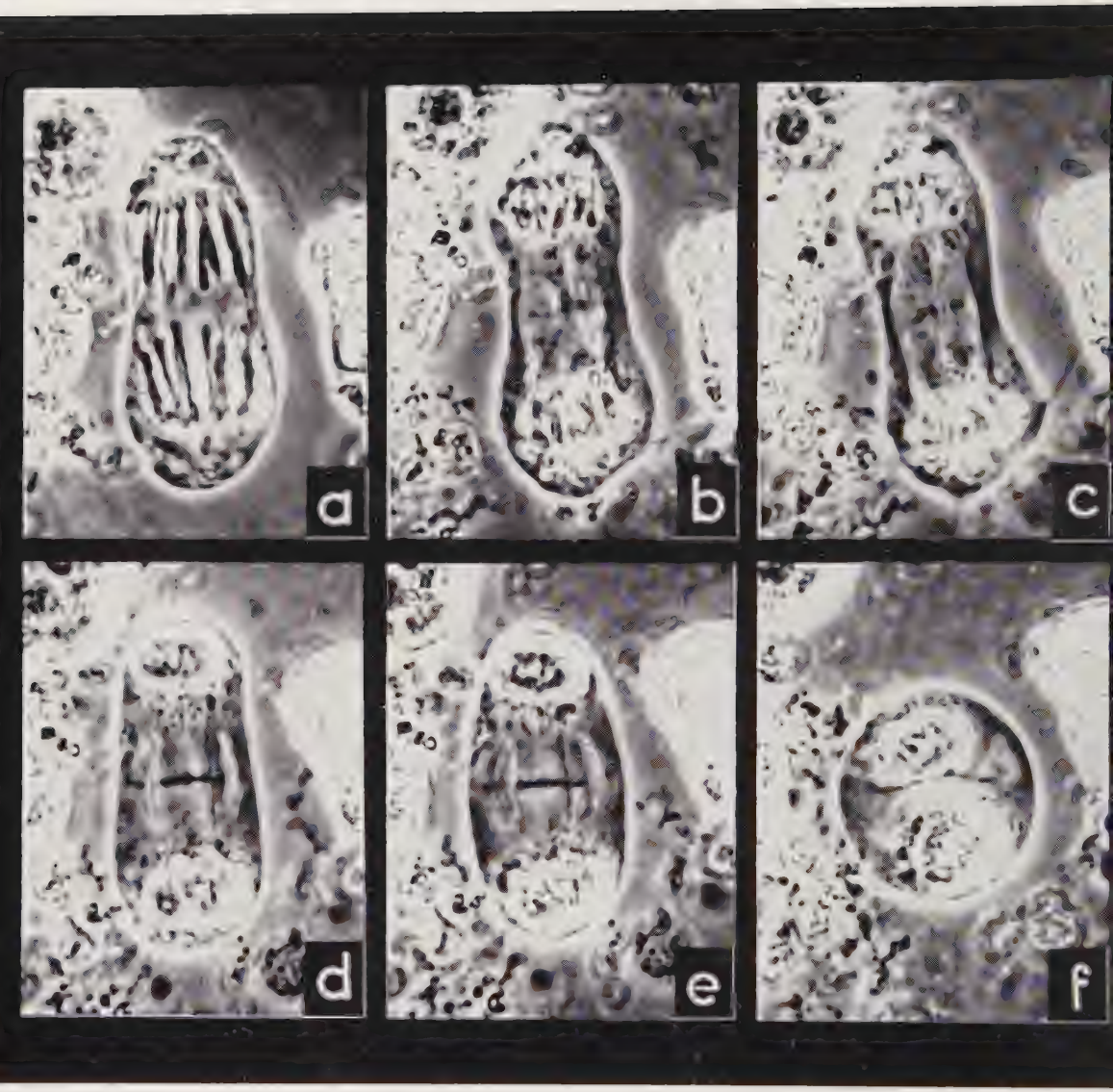


Figure 26. — Mitose d'une cellule vivante suivie en contraste de phase.
(*Haemanthus catharinae.*)
a, b, c, d, e, f : étapes successives de l'anaphase à la fin de la cytocinèse photographiées à intervalles de 5 minutes environ.

Evolution du fuseau en radiographie et sur le vivant.

De nombreuses observations font état d'une élongation du fuseau au cours de l'anaphase, ou plutôt d'un écartement des deux pôles. Le phénomène a été observé surtout dans les cellules animales où il prend parfois une grande ampleur, et plus rarement dans les cellules végétales. Ce fait est sans doute en relation avec l'existence d'une membrane rigide dans la cellule végétale. Cependant, Belar (1929) dans *Tradescantia* l'a clairement décrit.

Des observations personnelles faites en contraste de phase sur des cellules d'albumen d'*Haemanthus* en culture de tissus (technique de Bajer, 1955) nous ont montré ce phénomène avec une intensité comparable à celle des cellules animales (fig. 26). Il faut noter que dans ce cas, les cellules végétales sont dépourvues d'une membrane rigide et ressemblent en cela à des cellules animales. On peut constater que la cellule s'allonge en totalité selon l'axe du fuseau dès la mi-anaphase. Ce mouvement diminue progressivement avec l'édification de la paroi pour cesser complètement lorsque la cloison intercellulaire est achevée.

Utilisant les observations faites soit sur le vivant (Ris, 1949), soit en lumière polarisée (Hughes et Swann, 1948), soit au cours de microdissections (Carlson, 1952), les cytologistes, sur matériel animal ou végétal, ont cherché à dissocier les deux phénomènes:

— mouvement des chromosomes vers les pôles;

— élongation du fuseau.

Dans les cellules de la Sauterelle Chorthofaga il a été possible, au moyen d'Hydrate de chloral d'arrêter l'élongation du fuseau sans perturber la progression des chromosomes vers les pôles (Ris, 1949).

Selon Mazia (1961), deux types de connexion correspondent à ces deux mouvements:

— connexions chromosomes-pôles, qui ont tendance à se raccourcir;

— connexions pôle à pôle, qui ont tendance à s'allonger. L'existence des deux catégories de fibres sera envisagée dans la discussion consacrée à la constitution de l'appareil cinétique (p. 74).

Toutefois, en début d'anaphase, la radiographie ne montre pas de fibres continues, ni de connexions de pôle à pôle. La région interzonale est toujours la région la moins absorbante du contenu cellulaire; les éléments qui apparaissent finalement sont distribués au hasard.

Cette constatation a été renouvelée au cours d'expériences faites avec d'autres méthodes: Schmidt, 1939, Hughes et Swann, 1948, Taylor, 1960, montrent qu'en lumière polarisée la biréfringence diminue ou disparaît dans cette région médiane qui sépare les groupes anaphasiques de chromosomes. Les auteurs de ces travaux considèrent que la partie équatoriale du fuseau est un milieu isotrope. En microscopie électronique, d'après (Sedar et Wilson, 1951, Sato, 1958), il est impossible de mettre en évidence des fibres continues établissant des connexions «interzonales». Enfin, les expériences de micromanipulation montrent que la région interzonale est un territoire de faible résistance, tout comme les méthodes interférentielles d'analyse cytochimique révèlent la faible densité et la faible colorabilité de cette région (Rustad, 1959), alors qu'en fin d'anaphase, la partie équatoriale montre une forte densité et une intense colorabilité.

Par contre, au cours de la deuxième moitié de l'anaphase, il nous paraît possible d'adhérer aux vues de Mazia et de considérer comme vraisemblable que le fuseau de cytocinèse alors architecturé puisse jouer un rôle actif dans le mouvement d'expansion constaté entre les noyaux télophasiques.

II. — CYTOCINESE.

Nous avons constaté que la division du cytoplasme et l'édification de la cloison qui sépare les deux jeunes cellules étaient liées à la présence d'un appareil fusorial distinct de celui qui a assuré la division du noyau. Le phragmoplaste représente la région équatoriale d'un nouvel appareil fusorial édifié en fin d'anaphase, lorsque les structures visibles du fuseau de caryocinèse ont disparu.

De nombreux faits expérimentaux confirment ces observations. Des agents inhibiteurs ou destructeurs du «fuseau» ne peuvent plus empêcher la cytocinèse lorsqu'ils sont appliqués après un moment précis du cycle, qui est généralement la mi-anaphase. C'est précisément à ce moment que nous voyons se former les deux demi-fuseaux de cytocinèse à partir des pôles. Cornmann et Cornmann (1951) constatent dans l'œuf d'Oursin que la podophylline empêche la cytocinèse si elle arrive au contact du «fuseau» avant la mi-anaphase, mais ne peut plus l'empêcher ultérieurement, même si la caryocinèse est fortement perturbée. Swann et Mitchison (1953) font des observations analogues avec la colchicine, dans le même matériel; la cytocinèse se réalise même si le fuseau de caryocinèse et les asters sont complètement désorganisés par l'action de la drogue appliquée après la mi-anaphase. Hiramoto (1956) par des expériences de microdissection, effectuées sur des œufs d'Oursins, constate qu'en enlevant l'ensemble de

l'appareil mitotique, fuseau et asters, la cytocinèse est empêchée lorsque l'extraction a lieu avant la mi-anaphase; elle se réalise, par contre, si l'extraction a lieu plus tard. L'auteur fait remarquer que le plan de clivage se trouve situé à sa place normale, celle qui est déterminée par la position des pôles avant leur extraction. Des lésions expérimentales, provoquées par des rayonnements ultra-violets (Zirkle, 1957) ou de particules α (Dewis et Smith, 1957) localisés au fuseau métaphasique de cellules animales en épargnant les pôles, perturbent ou empêchent la caryocinèse mais n'affectent pas la cytocinèse.

Ces résultats sont en accord avec ce que montre la microradiographie: la cytocinèse est liée non pas au fuseau de caryocinèse mais à un nouveau fuseau, formé à partir des deux pôles en fin d'anaphase: ces pôles dont la présence est indispensable à l'organisation du fuseau au cours de l'anaphase, paraissent ne plus être nécessaires à partir du moment où les structures fusoriales responsables de la cytocinèse ont envahi ou sont en train d'envahir la masse du cytoplasme.

La nature des éléments fibrillaires du fuseau de cytocinèse.

Au moment de leur apparition à partir des deux pôles opposés vers la fin de l'anaphase, dans *Lilium*, ils se présentent comme des éléments fins, rectilignes, très nombreux et relativement peu absorbants. Après la rencontre des deux demi-fuseaux, ces fibrilles, qui sont raccordées les unes aux autres, deviennent plus épaisses et plus absorbantes dans la zone équatoriale. En mitose surtout, on est frappé par leur grand nombre, leur arrangement parallèle, serré, et leur grande longueur dans la région médiane qui s'étend entre les deux jeunes noyaux télophasiques. La forme fusoriale de l'ensemble, sa symétrie par rapport à l'axe et par rapport à l'équateur et sa forte absorption sont également remarquables.

Sur la nature de ces éléments fibrillaires, tels que les montrent les images de radiographie, il n'est possible que de faire des hypothèses.

On peut penser que ces fibres sont nouvellement formées à partir de matériaux d'origine cytoplasmique ou nucléaire. Mais on peut imaginer aussi que des éléments structuraux permanents du cytoplasme contribuent à l'édification de ces fibres ou prennent seulement une disposition parallèle à des structures proprement fusoriales.

Les observations de Porter et Machado (1960), en microscopie électronique, sont favorables à une hypothèse de ce genre puisque ces auteurs constatent, dans les cellules méristématiques d'*Allium*, que des éléments

du reticulum endoplasmique, tubulaires et lamellaires, se déplacent des pôles vers l'équateur au cours de l'anaphase en passant entre les chromosomes en mouvement vers les pôles. Lorsque les deux fronts se rencontrent à l'équateur, ils forment un enchevêtrement serré qui s'étend latéralement vers la paroi.

Il faut rapprocher de l'édification de cet appareil fusorial les changements qui surviennent dans les territoires de la cellule de division. Dans différents matériels, l'étude expérimentale a révélé une augmentation de densité et une accumulation d'ARN ou de ribonucléoprotéines dans la région interzonale au cours de l'anaphase et de la télophase; les deux observations sont liées.

Jacobson et Webb (1952) et Boss (1955) ont signalé une augmentation progressive de la concentration en ribonucléoprotéines dans la région équatoriale au cours de l'anaphase dans les fibroblastes de Poulet et de Triton. Ces auteurs pensent que le matériel basophile ainsi accumulé provient des chromosomes. Une observation identique a été faite dans *Solenobia* (Lépidoptère), par Ris et Kleinfeld (1952). Davies (1952) constate aussi l'accumulation de matériel absorbant pour les rayons ultraviolets dans la «région interzonale» de cellules d'embryon de Poulet. Rustad (1959) et Longwell et Mota (1960), étudiant en microscopie interférentielle la division de l'œuf d'Oursin constatent aussi, en fin d'anaphase, dans la région interzonale, une augmentation de masse attribuée à une accumulation de matériel. Shimamura et Ota (1956) observent, dans des cellules végétales, la présence d'acide ribonucléique au niveau des calottes polaires, en abondance dans le fuseau métaphasique, puis dans le phragmoplaste.

Evolution des constituants cellulaires au niveau du fuseau de cytocinèse.

La formation de la «plaque cellulaire» par fusion d'épaississements ponctiformes apparus sur les fibres du fuseau de cytocinèse, est en accord avec la cytologie classique. Des observations plus récentes, en microscopie électronique, s'accordent également avec les données de la radiographie: dans les cellules d'*Allium*, Porter et Machado (1960) voient les éléments du reticulum endoplasmique concentrés dans le plan de l'équateur avec des granules plus gros, entourés d'une membrane: les «phragmosomes». Il est difficile de dire si l'on peut faire correspondre à ces images les grains de matériel absorbant qui se présentent en radiographie comme des épaississements sur les fibres, puisque les fibres elles-mêmes n'apparaissent pas nettement en microscopie électronique.

Mais la microradiographie permet une observation neuve en cytologie. C'est un partage ordonné des constituants du cytoplasme avant l'édification de la cloison. Nous avons signalé, dans *Lilium*, la formation, de part et d'autre du plan équatorial, d'une zone lenticulaire, vide d'inclusions, et ne contenant que les fibres au niveau desquelles s'édifiera la cloison. L'orientation des éléments figurés du cytoplasme suggère que la division du territoire cellulaire est précédée d'un arrangement qui annonce une répartition ordonnée entre les cellules-filles. Nous avons décrit, dans le même matériel, le comportement d'inclusions denses refoulées sur un anneau équatorial par le développement des fibrilles. Le comportement de cette fraction dense du cytoplasme rappelle celui des chromosomes pendant la caryocinèse: ces inclusions se répartissent systématiquement et uniformément dans les deux territoires cytoplasmiques situés de part et d'autre de la zone lenticulaire dès qu'elle est formée.

Les observations faites sur radiographies, durant la méïose de *Lilium*, peuvent être utilement rapprochées des observations de Bajer et Mole-Bajer (1956) dans les cellules vivantes d'albumen de différentes Liliacées. Ces auteurs constatent qu'aucun mouvement n'est perceptible dans le cytoplasme des cellules en division jusqu'en fin d'anaphase. A ce moment-là, deux courants très nets venant des pôles opposés se recontrent dans la région centrale de la cellule et provoquent l'accumulation d'une masse de cytoplasme dans la région équatoriale. Les courants cessent durant quelques minutes, puis reprennent pendant que se forme le phragmoplaste, mais se dirigent en sens inverse en direction des pôles.

Il existe peut-être une relation définie entre l'ensemble structuré qu'est le fuseau de cytocinèse et les mouvements cytoplasmiques des régions contiguës.

D'ailleurs, dans une cellule animale, les deux ordres d'observation ont été réalisés par Selmann et Waddington (1955). Ces auteurs constatent, dans l'œuf de *Triturus alpestris*, une migration d'éléments cytoplasmiques (grains de vitellus) qui libère l'espace du futur plan de clivage avant la formation du sillon. Dans l'espace ainsi dégagé, ils observent de nombreuses fibres parallèles orientées perpendiculairement au plan équatorial. Les auteurs considèrent ces fibres comme des reliquats de fuseau, bien qu'ils expriment quelques doutes à ce sujet, du fait que ces fibres s'observent à une grande distance de l'axe du fuseau métaphasique. Fait remarquable: les images qui accompagnent cette description présentent une grande ressemblance avec les radiographies de cellules-mères de *Lilium* au stade qui précède l'édification de la cloison: on distingue nettement un espace lenticulaire, vide d'inclusions, traversé par les nombreuses fibrilles du fuseau de cytocinèse.

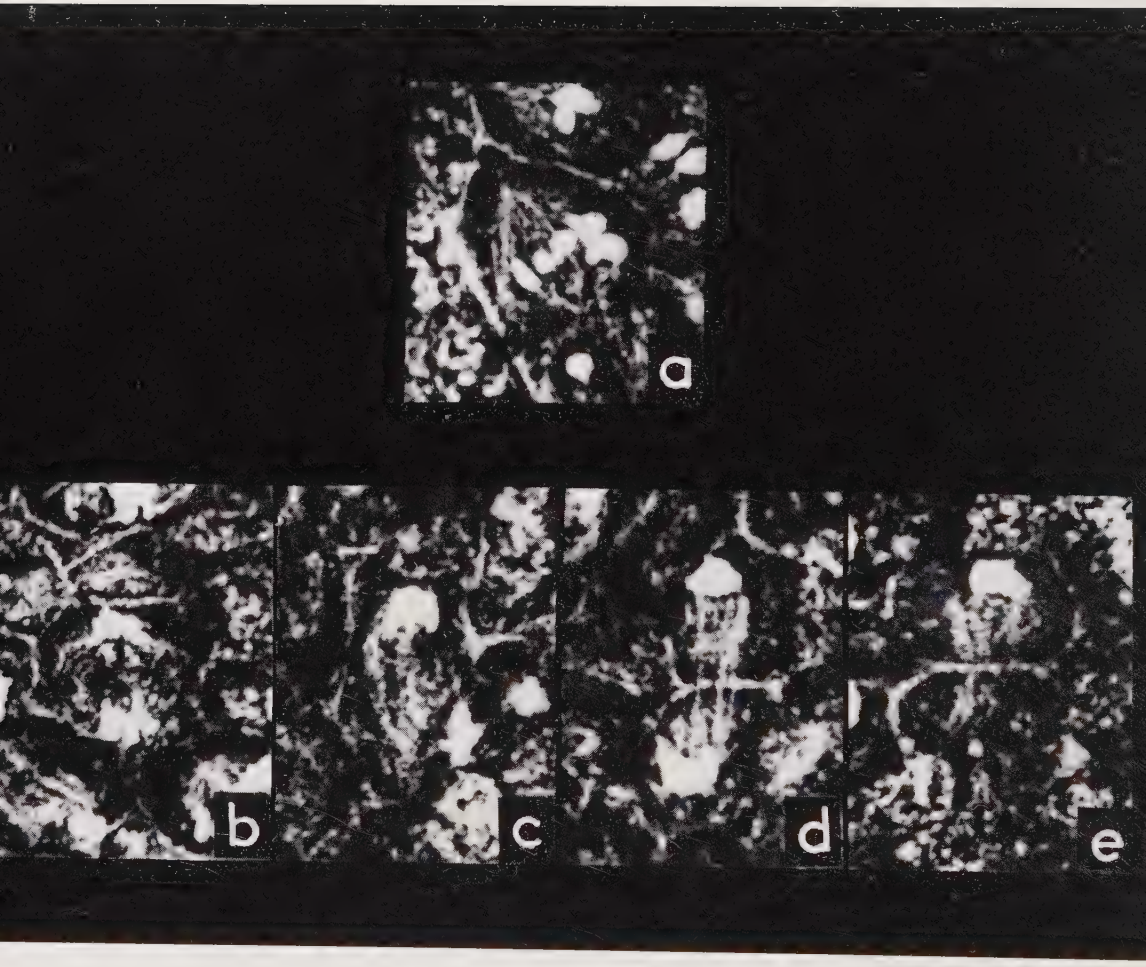


Figure 27. — *Locusta migratoria* — Méiose.
a : métaphase I.
b, c, d, e : étapes de la cytocinèse.
(× 1.550).

Le rôle du fuseau de cytocinèse dans l'édification de la cloison intercellulaire.

Du point de vue général, en ce qui concerne la position de la nouvelle cloison, sur l'équateur du fuseau de cytocinèse, il faut remarquer que les images de radiographie soulignent la netteté géométrique de la position qu'elle prend et qui est déterminée en définitive par les centres organisateurs de l'appareil cinétique.

Dans les cellules animales, la division du cytoplasme se révèle à l'observation par la formation d'un sillon de clivage. L'étude par radiographie des spermatocytes de *Locusta migratoria* a montré une grande analogie d'images avec les divisions des cellules végétales. Dans ce matériel, pris pour terme de comparaison, il est possible de constater la disparition complète du fuseau de caryocinèse et le développement d'un nouvel appareil fusorial fortement absorbant en fin d'anaphase. Sa structure orientée fibreuse est parfaitement nette, bien que les fibres paraissent moins régulièrement distribuées que dans les cellules végétales. Dans le plan équatorial de ce fuseau de cytocinèse, on voit s'établir une différenciation de matériel très dense, comparable à la «plaque cellulaire» précédemment décrite, et qui aboutit à la formation d'une paroi continue.

La cytocinèse de *Locusta* donne lieu à l'observation de deux faits remarquables: une élongation très importante du fuseau de cytocinèse, accompagnée d'une évolution particulière de sa forme.

Le fuseau de cytocinèse a envahi d'abord les régions périphériques du cytoplasme; ses fibres présentent alors une très forte courbure (fig. 27 b). L'appareil fusorial s'allongeant, cette courbure diminue; les structures fibreuses se tendent jusqu'à devenir parallèles lorsque le fuseau a atteint son maximum d'élongation. A ce moment, la cloison équatoriale est déjà formée, le fuseau commence à se rétrécir très fortement au niveau de cette cloison. En même temps, apparait une constriction annulaire sur la ligne de contact de cette paroi transversale avec la membrane de la cellule. Autrement dit, le sillon de clivage se forme à l'endroit précis où la cloison édifiée dans le plan équatorial du fuseau de cytocinèse touche la membrane cellulaire. Donc, le plan de division du cytoplasme de cette cellule animale est directement déterminé par le plan équatorial du fuseau de cytocinèse.

E - DISCUSSION ET CONCLUSION.

Des coupes radiographiées au moyen d'un rayonnement continu, aux intensités maxima pour les longueurs d'onde comprises entre 16 et 22 Å, donnent des microradiogrammes utilisables pour l'analyse cytologique. L'intensité de radiation transmise à travers les structures biologiques dépend de leur capacité d'absorption des rayons X; on peut donc obtenir des images de constituants permanents des cellules aussi bien que des structures qui apparaissent au cours des divisions.

Remarquons en premier lieu que l'image d'absorption des rayons X coïncide topographiquement avec celle qui nous est familière. Les constituants principaux de la cellule apparaissent avec leurs contours reconnaissables, et on peut suivre leur évolution au cours des étapes de la division.

Sont absorbants, à des degrés divers, dans tous les matériels observés: la membrane, au niveau du noyau: les chromosomes et le nucléole, les éléments figurés du cytoplasme, les structures fibreuses qui apparaissent au cours de la caryocinèse et de la cytocinèse. Par contre, sont à peu près transparents au rayonnement: la caryolymphe, le milieu qui apparaît sur les images comme substance fondamentale du cytoplasme et le matériel de fond du fuseau de caryocinèse.

D'autre part, on peut constater que l'opacité de certaines parties de la cellule change au cours du déroulement des cinèses. Par exemple, dans le cytoplasme, les inclusions sont plus nombreuses ou bien la substance fondamentale change de texture dans l'ensemble de la cellule, pendant la prophase. La région du phragmoplaste, en fin de division, devient très absorbante.

Ces différences d'opacité mettent en évidence les changements d'architecture qui accompagnent la division du noyau et celle du cytoplasme. Les grands traits nous en sont connus, mais grâce au rayonnement utilisé, la résolution de l'image obtenue sur radiogramme, a permis de voir des structures cellulaires qui échappent à l'analyse cytologique, même aux forts grossissements du microscope optique.

Dans son étude de l'application de la microradiographie au matériel biologique, Lindström (1955, p. 119) reproduit des microradiogrammes où se voit la précision croissante des images par l'utilisation de tensions variant de 5 à 0,8 kV. Ceux qui sont présentés ici peuvent constituer un compléments à cette information. Ils confirment que la microradiographie permet une exploration du contenu de la cellule.

On peut envisager

— la recherche d'une *analyse* par *absorption différentielle* puisque les observations sont possibles à la limite du pouvoir de résolution du microscope optique;

— l'utilisation des données recueillies pour la compréhension de quelques-uns des *mécanismes mis en jeu dans la division cellulaire.*

Absorption différentielle.

L'*absorption différentielle* sur laquelle se fonde la méthode suppose une variation de la nature chimique et de la masse, d'après les lois d'absorption des rayons X. L'application au matériel biologique a déjà donné lieu à une interprétation quantitative de l'absorption dans laquelle sa valeur est convertie en masse par unité de surface (Engström, Lindström). Sur les coupes histologiques des cellules ont pu être isolées. Les résultats les plus intéressants ont été fournis par l'étude comparée de l'opacité des cellules d'un tissu ou des étapes de la transformation d'un type de cellule (Lindström, 1955). Les microradiogrammes que nous avons réalisés avec les stades de division montrent une topographie de régions absorbantes, qui serait, selon ce point de vue, l'image d'une répartition des constituants cellulaires d'après leur densité.

Une concordance d'images très remarquable se trouve pour *Lilium*. dont les cellules-mères en méiose avaient donné lieu à des expériences de micro-incinération (Uber et Goodspeed, 1935) avec un matériel très voisin de celui que nous avons utilisé pour la microradiographie. Après un séjour à 600° pendant 2 ou 3 heures, la distribution des cendres dans les cellules-mères coïncide exactement dans son contour avec la distribution des ombres d'absorption du radiogramme (Bot. Gaz., vol. 97, p. 418). On retrouve, de manière aussi précise, le tracé limite de la caryolymphe et du cytoplasme. La caryolymphe est dépourvue de résidu minéralisé, tout comme elle est transparente au rayonnement X. Il en est de même pour la partie principale du fuseau, en début d'anaphase. Par contre, les dépôts les plus compacts appartiennent aux constituants qui sont aussi les plus absorbants sur radiographie: les chromosomes, les inclusions cytoplasmiques, la membrane.

Nous remarquons qu'en début d'anaphase, les chromosomes sont en partie «squelettisés» avec une hélice apparente, et, en même temps, on ne distingue aucun tracé de fibre chromosomique. Il y a là une indication qu'il faudrait pouvoir préciser et renouveler, car les chromosomes restent entièrement absorbants aux rayons X tant qu'ils sont pourvus d'enveloppe chromatique. La périphérie des chromosomes et les fibres qui sont absorbantes seraient-elles constituées de matériaux moins minéralisés, en tout cas distincts des nucléoprotéines chromatiques? On doit rapprocher ce fait

Composition élémentaire de substances organiques.

	% C	H	N	O	S	P
Protéine végétale	52	6,9	17,6	22,5	0,9	
A D N	37,1	4,1	15,1	34,6		8,9
A R N	35	4,1	16,5	34,7		9,7

Coefficients d'absorption.

	16 λ.	18 λ.	20 λ.	22 λ.
C	4000	5500	7300	9400
N	6400	8800	11300	14400
O	8500	11500	14900	18500
P	3700	5100	6700	8800
S	4600	6400	8400	10800
K	7800	10800	14000	16500
Ca	8800	12000	15500	20000
Fe		3000	3700	4600
Protéine végétale	5160	7060	9220	11690
A D N	5730	7820	10180	12870
A R N	5770	7870	10240	12940

(Extrait de tables reproduites par LINDSTRÖM, 1955, p. 69, 70 et 73.)

de la formation de la fibre à partir d'une substance qui provient de la surface des chromosomes, d'autre part de la constatation que des chromosomes «squelettisés» se voient aussi après action de la colchicine, en même temps que manquent les fibres. La concordance d'ensemble de la topographie d'absorption et celle des résidus d'incinération est frappante. Une question se trouve posée: la signification des images est-elle la même?

L'analyse des cendres n'ayant pas été faite *in situ*, Uber et Goodspeed remarquent que, parmi les éléments minéraux susceptibles de donner des cendres, le Phosphore est présent dans la chromatine et toutes les nucléoprotéines. Il est naturel de rapprocher cette présence de phosphore d'un dépôt de cendres compact au niveau des chromosomes. Des inclusions cytoplasmiques laissent un résidu minéralisé qui peut aussi être attribué à la présence de P: les analyses de membranes mitochondriales révèlent une teneur élevée en phospholipides et nucléotides enzymatiques.

Si nous nous reportons aux valeurs numériques fournies par l'étude quantitative de l'absorption des rayons X, il faut envisager:

— le coefficient d'absorption des éléments les plus fréquents dans les substances organiques C, N, O, P, S, K, Ca, Fe;

la composition élémentaire de substances qui participent à la constitution de la cellule: protéine végétale, acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques;

— le coefficient d'absorption global de ces substances tel qu'il a été calculé d'après les données précédentes: proportions relatives des éléments, et coefficient d'absorption propre à chacun.

Ces valeurs ont été groupées dans les 3 tableaux p. 71, qui sont extraits de ceux que reproduit Lindström (1955).

Nous constatons bien qu'il y a concordance entre la plus forte valeur du coefficient d'absorption des acides nucléiques et l'opacité des régions où ils sont présents; mais l'étude quantitative de l'absorption présentée par cet auteur montre que les éléments tels que P, S, n'interviennent pas de manière significative dans la valeur globale du coefficient caractéristique d'une substance organique. Ce sont les proportions de C, N, O, qui sont déterminantes, surtout celle de l'Oxygène. Des protéines très diversement constituées ont la même composition élémentaire et même pouvoir d'absorption.

La distinction de protéine végétale et d'acide nucléique reste schématique pour le cytologiste. La méthode qui permet de relier l'intensité de l'absorption à la masse de matière traversée conduit à des évaluations égale-

ment très schématiques. Par exemple, dans les coupes d'anthères sur lesquelles a été appliquée la microradiographie (Dahl, Rowley, Stein, Wegstedt, Exp. Cell Res. 13, 31-46, 1957), on peut reconnaître, avec un grossissement × 300, que les parois des cellules-mères augmentent d'opacité du début à la fin de la méiose, ce qui peut s'exprimer en poids par unité de surface, et donner les valeurs: 0.70, 2.11, 4.63, 9.25 l'unité étant 10^{-11} gr/μ^2. La nature des substances absorbantes est indéterminée.

Pourtant, dans son application proprement *cytologique*, la microradiographie nous met en présence de la finesse d'architecture du contenu de la cellule, de ses profondes transformations au cours de la division. Du point de vue de l'analyse quantitative, ces remaniements de matériaux peuvent prendre de l'intérêt par une *différenciation plus fine* de l'opacité ou de la transparence aux rayons X dans les diverses parties de la cellule.

La masse des chromosomes est indistinctement opaque au rayonnement. A leur niveau, sont concentrées des substances hautement polymérisées, des acides nucléiques à coefficient d'absorption élevé, des éléments minéraux qui laissent un résidu (sans doute P). Ces éléments minéraux paraissent localisés principalement sur l'axe hélicoïdal que la radiographie ne sépare pas. Par contre, elle met en évidence les fibres chromosomiques, dépourvues semble-t-il d'élément minéral résiduel; leur opacité résulte peut-être de la concentration de matériel dont les molécules sont orientées suivant des lignes de force. Elles apparaissent sur un fond que la déshydratation a rendu très perméable au rayonnement.

Mécanismes de la division cellulaire.

Ce phénomène si complexe pose des problèmes qui se rapportent à la constitution de l'appareil cinétique et aux mécanismes qu'impliquent les mouvements effectués par les chromosomes et les inclusions du cytoplasme.

L'appareil cinétique: nous suivrons Schrader, le grand spécialiste de l'étude des cinèses, pour qui l'origine et la structure des divers éléments de l'appareil mitotique doivent être toujours mieux connues, afin qu'un nombre croissant de problèmes de la mécanique des divisions se trouvent résolus. Les deux structures que la microradiographie a permis d'étudier sont: les centres organisateurs et le fuseau.

1) *Les centres organisateurs.*

Ils se manifestent par la présence d'asters. Nous avons rappelé, en signalant leur existence chez les Plantes à fleurs, que, du point de vue de

la cytologie descriptive, les asters n'apparaissent pas comme des éléments permanents, si bien qu'on a parlé de la «perte complète du centrosome» dans certains groupes végétaux (Lepper, 1956).

La formation du fuseau dans les cellules en division est conforme à un schéma général, qu'il y ait ou non un centriole visible. Ce fait établit avec force la notion de centre cinétique, n'apparaîtrait-il à l'observation que comme le point de convergence des centromères dans le mouvement anaphasique. Les cytologistes dont l'expérience est étendue ont toujours considéré que l'absence d'un aster visible dans un grand nombre de cellules n'est pas en contradiction avec le concept de centre. Reiss (1947) écrit: «Nous pouvons admettre avec Belar et Geitler l'existence de pôles non différenciés morphologiquement». Cette différenciation concerne principalement les raies astériennes dont la partie distale est rendue visible par les inclusions du cytoplasme orientées sur leur trajet.

Il semble nécessaire de concevoir l'existence d'un centre comme pôle d'activité, qui agit plus ou moins fortement sur le cytoplasme en déterminant la formation de structures rayonnantes.

— En microscopie optique, l'observation porte principalement sur les parties périphériques de la striation, c'est-à-dire la région plus ou moins différenciée suivant les types de cellules. Les asters sont apparents, surtout dans les cellules sans paroi rigide.

— La microradiographie révèle la partie centrale, sans doute essentielle, du dispositif, un aster à rayons courts, résultant d'une action d'intensité réduite sur le cytoplasme, ou portant sur un champ limité. Cette situation caractérise les Plantes à fleurs.

L'aster, observable comme figure temporaire, caractéristique de la cinèse, doit être rattaché à une structure dont l'existence est générale, une partie de l'appareil mitotique de toutes les cellules. Il peut être intéressant de situer par rapport à la chronologie des faits connus, les images obtenues sur radiogrammes.

La curiosité qu'ont suscitée les figures d'asters s'est exprimée dans une littérature volumineuse, qui a fait l'objet de revues: en 1928 par Heilbrunn du point de vue physiologique, en 1929 par Wassermann du point de vue cytologie.

Chambers, 1917-21, se représente un système de tubes ou travées rayonnantes, formés d'un gel qui canalise le mouvement centripète du hyaloplasme plus fluide qui s'écoule. Ces structures radiées peuvent disparaître par une très légère intervention, et du même coup la disposition

rayonnante des inclusions distribuées sur leur trajet. Avec des variantes, d'autres auteurs ont exprimé une manière de voir identique, du moins en ce qui concerne l'interprétation de raies astrales comme trajets d'écoulement: Spek, 1918, Pollister, 1941 (cités par Schrader).

La notion de particules qui s'ordonnent en formations parallèles s'est associée tout naturellement à celle de tractus d'écoulement. L'étude du hyaloplasme, qui constitue le fond de la cellule, révèle sa constitution en grande partie protéique. Plusieurs publications importantes sont consacrées aux grandes molécules de la «protéine de structure»: Bensley et Hoerr (1934), Mirsky (1936), Bensley (1938).

Schmidt (1936-1937) montre alors la biréfringence des asters sur le vivant, qui se trouve expliquée par l'orientation des micelles sur le trajet des stries, et l'orientation des chondriosomes voisins entraînés dans le même sens. Inoué (1953), par le même procédé d'examen en lumière polarisée de cellule vivante, obtient confirmation de l'orientation des molécules ou des micelles dans la région de l'aster. On peut comprendre qu'à l'observation avec le microscope l'image de stries rayonnantes n'apparaisse pas si le phénomène qui induit l'orientation des particules du hyaloplasme n'a qu'une faible ampleur. Les matériaux remaniés ont même indice de réfraction que la partie homogène du fond. Mais le tractus plus dense qui se constitue peut devenir visible en radiographie, parce qu'il est opaque aux rayons X.

2) *Le fuseau.*

En microscopie optique, l'aspect fibrillaire du fuseau a donné lieu à de nombreuses descriptions et suscité des controverses, du fait que les fibres, non visibles sur le vivant, étaient décrites sur des préparations de matériel fixé. Mais l'utilisation d'une nouvelle méthode a levé l'incertitude.

En lumière polarisée, Schmidt (1939) a montré la biréfringence du fuseau, et trouvé que cette biréfringence est la même sur le matériel fixé que sur le vivant, démontrant ainsi que l'aspect fibrillaire du fuseau n'est pas un artefact de fixation, bien qu'il ne soit jamais visible sur la cellule vivante. Après lui, d'autres auteurs ont utilisé cette méthode avec des résultats concordants. Hughes et Swann (1948), Swann (1952), Taylor (1959, 1960), Inoué (1952, 1953), Inoué et Bajer (1962) ont pu montrer, en lumière polarisée sur le vivant, les fibres chromosomiques en métaphase dans la cellule animale de *Chaetopterus* et la cellule végétale d'*Haemanthus*. L'ensemble des observations faites par ce moyen a permis d'acquérir la

certitude que les fibres, par lesquelles se manifeste tout l'appareil mitotique, sont réelles; elles se présentent sur le vivant avec la même topographie que sur les préparations de matériel bien fixé.

Au niveau du fuseau, les cytologistes distinguent: des fibres continues et des fibres chromosomiques.

La biréfringence du fuseau est bien établie depuis les travaux de Schmidt au moyen de la lumière polarisée. Cet auteur a pu préciser qu'il existe, à ce niveau, une orientation parallèle de molécules protéiques. Mais l'existence de fibres continues reliant les deux pôles n'a pas été démontrée avec certitude dans tous les matériels étudiés. Les difficultés de l'observation en optique ordinaire sont connues. Schrader a bien marqué la différence des conditions dans lesquelles s'observent, d'une part, les raies astrales sur le fond du cytoplasme, d'autre part, les fibres fusoriales qui apparaissent sur le fond constitué par la masse du fuseau, un milieu dont les propriétés physiques sont vraisemblablement différentes de celles du hyaloplasme.

Enfin, jusqu'en fin de métaphase, les fibres chromosomiques constituent deux demi-fuseaux, qui se superposent à une éventuelle fibrillation continue entre les pôles.

En microradiographie, l'appareil cinétique de caryocinèse apparaît comme une unité morphologique structurée au centre de l'espace cellulaire. Il comprend, nous l'avons vu: les fibres chromosomiques individuelles, très absorbantes, limitant un espace faiblement ou non absorbant.

Les fibres chromosomiques apparaissent sous la forme de tractus, nettement différenciés, distincts de la substance fondamentale du fuseau dont elles semblent constituer la charpente ou le squelette. Selon le matériel, elles sont fines, ou plus ou moins épaisses: en première division de méiose, elles paraissent généralement plus fortes qu'en mitose. Leur tracé les fait apparaître comme des cordons. Il arrive qu'on puisse deviner une structure finement fibrillaire (*Lilium*). Leur forte absorption des rayons X est l'indice d'une densité élevée. Il n'est pas possible, à partir de leur seule image, de dire dans quelle mesure les fibres chromosomiques en métaphase sont souples ou rigides. La rigueur de leur tracé et la symétrie de l'ensemble qu'elles constituent, suggèrent une certaine rigidité. Cependant, des éléments souples, soumis à des tensions qui s'équilibrent, pourraient donner les mêmes images.

Il apparaît nettement sur les microradiographies qu'elles constituent une connexion directe du centromère au pôle correspondant. Le fuseau métaphasique est distinctement formé de deux demi-fuseaux (fig. 20 p. 42).

La description du comportement du fuseau (p. 61) nous a déjà conduit à constater qu'en début d'anaphase il n'est pas possible de caractériser une connexion de pôle à pôle. Seules, les fibres chromosomiques sont les éléments d'architecture visibles, par leur opacité aux rayons X. D'autres structures longitudinales de la masse du fuseau peuvent exister, mais leur densité n'est pas suffisante pour que l'absorption à leur niveau se traduise par un tracé sur les radiogrammes. Dans les cas où a été décrit un fuseau central apparemment dense d'un pôle à l'autre, la situation est peut-être différente (Cleveland).

Les fibres chromosomiques sont les éléments structuraux majeurs du fuseau métaphasique que la radiographie isole nettement. Elles sont assez denses pour être très absorbantes. Au problème que pose leur formation, la radiographie apporte aussi des éléments positifs. Théoriquement, une connexion directe entre le centromère et le pôle peut se concevoir de deux manières:

— par l'interaction de ces deux éléments actifs: pôle et centromère,

— par l'activité du centromère seul.

L'idée d'une sécrétion provenant du chromosome, et plus spécialement du centromère est plusieurs fois exprimée dans la littérature. Shiwago et Troukhatchewa (1939-40) peuvent mettre en évidence les «fibres tractrices» au moyen d'hydrolyse par l'acide sulfurique et coloration à l'hématoxyline ferrique. Ces auteurs pensent qu'elles se forment à partir d'une substance qui s'écoule des chromosomes en métaphase.

L'opinion de Wada que partage Swann (1952), selon laquelle une sécrétion, provenant du centromère, établit la liaison avec le pôle est intéressante à évoquer; nous l'avons déjà rapprochée des observations faites sur radiographies. Toutefois, elle ne peut être séparée de l'action polarisante directe du centre, qui se manifeste là comme au niveau des stries astériennes par une orientation des infrastructures du hyaloplasme. L'hypothèse confirmée d'une substance cimentant molécules ou micelles, groupées en faisceau, satisfait notre compréhension et permet de coordonner les observations faites sur la densité de la fibre, sa colorabilité, l'existence de structures orientées entre le pôle et le noyau.

3) *Fuseau de cytocinèse et structures interzonales.*

L'existence d'un fuseau de cytocinèse à structure fibreuse, tel qu'il apparaît en microradiographie, est en accord avec les données fournies par d'autres méthodes. Les observations faites en fin d'anaphase, relatives aux «fibres continues» de la «région interzonale», à «l'appareil mitotique»

de télophase, ou au «phragmoplaste» se rapportent en réalité à des stades d'évolution ou à des aspects d'évolution du «fuseau de cytocinèse» tel que nous l'avons caractérisé.

Belar (1929 b) observe dans les cellules vivantes de Tradescantia des «lignes» qui apparaissent en fin d'anaphase et disparaissent rapidement quand se forme la plaque cellulaire. Il les considère comme des «lamelles» plutôt que comme des «fibres» et pense qu'elles doivent être identiques aux «fibres continues» observées par d'autres auteurs. La direction préférentielle de déplacement de particules soumises au mouvement brownien lui paraît être un argument en faveur d'une structure lamellaire du phragmoplaste.

Oestergren (1954) signale, chez *Allium* et *Crepis*, l'existence de structures comparables à des «raies astrales» en fin d'anaphase et en télophase, dans des cellules normales ou traitées au Pyramidon.

La notion de «fusome», proposée par Hirschler paraît comporter un ensemble de structures correspondant à des connexions interzonales et des fibres nouvellement constituées.

L'existence d'une structure fibreuse dans la région interzonale de cellules animales a fréquemment été signalée et comparée à un «phragmoplaste»: Wassermann, 1929, Hughes et Swann, 1948. Depuis Errara, le phragmoplaste est, pour les cytologistes, «le fuseau en voie d'élaboration de la plaque cellulaire».

L'observation de cellules vivantes en lumière polarisée a confirmé l'existence de structures «orientées» en fin de division. Schmidt (1939) et Hughes et Swann (1948) ont constaté une biréfringence positive dans le sens de l'axe du fuseau métaphasique, l'absence de biréfringence de la région interzonale en début d'anaphase et une nouvelle biréfringence qui apparaît dans la zone équatoriale au moment du clivage. Ces auteurs notent que cette dernière est beaucoup plus forte que celle du fuseau métaphasique et comparent la structure de cette région à celle du phragmoplaste des cellules végétales.

Plus récemment, Inoue (1952, 1953), Inoue et Bajer (1961) ont pu mettre en évidence sur le vivant la biréfringence de la «région interzonale» en fin d'anaphase. Pour Inoue, les fibres continues n'ont pas disparu comme structures, mais ont subi un gonflement qui a effacé les stries apparentes. La réapparition de structures fibreuses correspondrait au retour à l'état initial par déshydratation.

Ce que les radiogrammes mettent particulièrement bien en évidence, c'est la fibrillation nouvelle qui apparaît en fin d'anaphase. Elle constitue un ensemble très cohérent; il semble justifié de la considérer comme un nouveau fuseau: le *fuseau de cytocinèse.*

Dans une division cellulaire normale, où caryocinèse et cytocinèse se succèdent immédiatement, le fuseau de cytocinèse est édifié sur le même axe, de sorte que les plans équatoriaux successifs coïncident; mais les éléments structuraux du second fuseau s'étendent sur l'ensemble du territoire cytoplasmique, alors que les fibres de caryocinèse n'occupaient qu'un espace restreint au centre de la cellule.

La dissociation des deux appareils cinétiques dans leur formation et dans leur fonctionnement peut être observée au cours de l'évolution normale de certaines cellules: le cas des cellules-mères, au moment de la formation de la tétrade, a déjà été décrit dans *Listera ovata.* Dans l'étape initiale de la formation de l'albumen, les cytologistes ont décrit comme «fuseaux secondaires» des fuseaux plus étroits que les «fuseaux de division»; c'est au niveau de leurs plaques équatoriales que s'élaborent de manière synchrone les cloisons nouvellement formées au cours de cette «syntomie».

Le cas des endomitoses des cellules nourricières peut aussi être cité pour comparaison, puisqu'à l'intérieur d'une seule cellule peuvent se succéder ou se réaliser simultanément plusieurs fuseaux, entre des groupements télophasiques constitués; mais aucun cloisonnement n'intervient.

Il a été possible d'observer le partage du cytoplasme et l'édification d'une cloison, sans appareil cinétique. Dans *Ornithogalum umbelatum,* nous avons pu mettre en évidence un cloisonnement anormal qui n'est pas consécutif à une mitose classique (Dietrich, 1958). Un plan de division apparaît sur toute une file de cellules, comme si se manifestait une intervention extérieure à la cellule à partir des lignes de rencontre des cloisons cellulaires.

En ce qui concerne les mécanismes de la cinèse, la radiographie apporte des informations utiles, principalement sur deux points; il s'agit de deux phénomènes qui se situent au niveau de la fibre chromosomique:

— la mise en place des chromosomes sur le plan équatorial;

— le mouvement anaphasique au niveau de la fibre de chaque chromosome.

L'analyse des mouvements prémétaphasiques permet de comprendre comment se réalise l'équilibre de la masse symétrique du bivalent sur un

fuseau à orientation bipolaire: les connexions s'établissent successivement avec l'un, puis avec l'autre pôle.

La microradiographie met en évidence la morphologie de chaque fibre chromosomique et son évolution sur le trajet centromère-pôle: elle se tend, puis se raccourcit au cours de la progression du chromosome vers le pôle. On est conduit à envisager que le chromosome est acheminé du plan métaphasique au pôle par un mécanisme comportant une traction qui s'exerce au moyen de cette fibre.

Les images microradiographiques montrent — c'est un fait d'observation — le raccourcissement de la fibre de chaque chromosome, mais le mécanisme de cette réduction progressive reste hypothétique. La fibre diminue de longueur sans augmenter en épaisseur. Cela implique que le raccourcissement s'accompagne d'une élimination de matière. Lorsque les chromosomes sont arrivés aux abords du pôle, les fibres ont disparu comme si elles avaient été détruites. La question se pose de savoir à quel endroit s'opère cette destruction.

L'idée d'une résorption à l'extrémité centromérique a été proposée par Stich (1954): la fibre étant progressivement détruite au contact du centromère, celui-ci arriverait finalement au pôle; Motta (1957) préfère supposer un mécanisme de propulsion du centromère qui rejette le matériel démoli dans la région interzonale; Mazia (1956) suggère que le centromère produit une contraction locale de la fibre dans la région adjacente; Inoue (1959) pense aussi à une réduction locale du matériel orienté, au voisinage du centromère. L'observation des radiographies nous conduit plutôt à imaginer une désintégration des fibres au voisinage du pôle. C'est en effet dans cette zone qu'en fin d'anaphase on constate une augmentation de l'absorption; elle pourrait être due à la présence de matériaux dispersés, provenant des fibres.

Tels qu'ils ont été obtenus, les microradiogrammes du contenu et des divisions cellulaires apportent tout un faisceau d'informations qui justifient l'utilisation de la microradiographie comme méthode cytologique.

Nous ne pouvons comprendre la cinétique de la division que par une étude approfondie de l'évolution des constituants achromatiques de la cellule. Il faut remarquer que la microradiographie apporte, avec une netteté frappante, la démonstration du rôle directeur essentiel des centres organisateurs de la mitose durant le déroulement de la caryocinèse, puis de la cytocinèse.

— Par le perfectionnement de l'absorption différentielle, la méthode pourra peut-être constituer un moyen d'analyse physico-chimique des constituants de la cellule.

— Par une amélioration du pouvoir de résolution, on pourrait envisager de confronter les observations sur microradiogrammes avec celles de la microscopie électronique, en retrouvant les éléments chacun à chacun.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMSTONE, F. B. — 1952 — Structure of the Golgi apparatus of nerveganglion cells as shown by the application of desilvering methods to standard Da Fano preparations. — *J. Morph.*, **90.** *201-216.*

ADAMSTONE, F. B. and TAYLOR, A. B. — 1953 — Living spinal Ganglion cells of Rat. — *J. Morph.*, **92,** *513-526.*

AMANO, S. — 1957 — The structure of the Centrioles and Spindle Body as observed under the Electron and Phase Contrast Microscope S — A New Extension fiber theory concerning mitotic Mechanism in Animal Cells. — *Cytologia* **22,** *193-212.*

ANGERER, E. V. — 1939 — Wissenschaftliche Photographie. — *Leipzig.*

ASUNMAA, S. K. — 1960 — X-Ray sensitive recording materials for electron optical contrast. — *Proc. 2nd intern. Symposium, Stockholm, 66-78.*

BAJER, A. — 1951 — Studies on the spindle and chromosome movement. *Acta Soc. Bot. Pol.* **21,** *95-111.*

BAJER, A. — 1953 — Observation on spindle structure and persisting nucleoli. — *Acta Soc. Bot. Pol.* **22,** *653-666.*

BAJER, A. — 1953 — Endosperm-valuable material for experimental studies of mitosis in vivo. — *Acta Soc. Bot. Pol.* **22,** *475-482.*

BAJER, A. — 1953 — Absolute viscosity and living mitotic spindle structure. *Acta Soc. Bot. Pol.* **22,** *331-348.*

BAJER, A. — 1954 — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. I. - *Acta Soc. Bot. Pol.* **23,** *383-412.*

BAJER, A. — 1957 — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. III. The origin of the mitotic spindle. — *Exp. Cell. Res.* **13,** *493.*

BAJER, A. — 1958 — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. IV. The mitotic contraction stage. — *Exp. Cell. Res.*, **14,** *245-256.*

BAJER, A. — 1961 — A note on the behaviour of spindle fibres at mitosis. *Chromosoma* **12,** *64-71.*

BAJER, A. and MOLE-BAJER, J. — 1954 — Endosperm material for studies on physiology of celldivision. — *Acta Soc. Bot. Pol.* **23,** *383-412.*

BAJER, A. and MOLE-BAJER, J. — 1956 — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. II. Chromosome, cytoplasmic and Brownian movements. *Chromosoma,* **7,** *558-607.*

BAKER, J. R. — 1958 — Principles of Biological Microtechnique. — *Methuen, edit., London.*

BARBER, H. N. — 1939 — The rate of movement of chromosomes on the spindle. - *Chromosoma* **1,** *33-50.*

BARBER, H. N. and CALLAN, H. G. — 1943 — The effects of cold and colchicine on mitosis in the newt. — *Proc. Roy. Soc. B.* **131,** *258-271.*

BEAMS, H. W., EVANS, T. C., VAN BREEMEN, V. and BAKER, W. W. — 1950 — Electron microscope studies on structure of mitotic figures. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74,** *717-720.*

BECKER, W. A. — 1935 — Über einige Streitfragen der Zellteilung. — *Z. Zellforsch.*, **23,** *253-260.*

BECKER, W. A. — 1938 — Recent investigations in vivo on the division of plant cells. — *The Bot. Rev.* **4,** *446-472.*

BELAR, K. — 1929a — Beiträge zur Kausanalyse der Mitose. II. Untersuchungen an den Spermatocyten von Chorthipus lineatus. — *Roux Arch.*, **118,** *359-484.*

BELAR, K. — 1929b — Beiträge zur Kausanalyse der Mitose. III. Untersuchungen an den Staubfadenhaarzellen und Blattmeristemzellen von Tradescantia virginica. — *Z. Zellforsch.* **10,** *73-134.*

BERNHARD, W. — 1958 — Ultrastructural aspects of nucleoplasmic relationship. *Exp. Cell. Res. Suppl.*, **6,** *17.*

Bernal, J. P. — 1940 — Structural units in cellular physiology. — *Publ. Amer. Ass. Adv. Sci.*, **14**, *199-205*.

Bleier, H. — 1939 — Mechanismus der Kernteilung. — *Arch. Expt. Zellf.*, **22**, *257-262*.

Bonnevie, K. — 1947 — On the mechanics of mitosis. — *J. Morph.* **81**, *399-415*.

Boss, J. — 1954 — Mitosis in culture of newt tissues. — *Exp. Cell. Res.* **7**, *443-456*,

Boss, J. — 1955 — Mitosis in cultures of newt tissues. — *Exp. Cell. Res.* **8**, *181-187*.

Bowen, R. H. — 1928 — Studies on the structure of plant protoplasm. II. — *Z. Zellf.* **9**, *1- 66*.

Brown, S. W. — 1954 — Mitosis and meiosis in Luzula campestris D. C. — *Univ. Calif. Publ. Botany* **27**, *231-278*.

Brown, V. and Emery, H. P. — 1957 — Persistent nucleoli and Grass systematics. — *Am. J. Bot.* **44**, *585-589*.

Buchsbaum, R. and Williamson, R. — 1943 — The Rate of elongation and constriction of dividing sea urchin eggs as a test of a mathematical theory of cell division. — *Physiol. Zool.* **16**, *162*.

Buvat, R. — 1961 — Le réticulum endoplasmique des cellules végétales — *Ber. Deutsch. Bot. Gesel*, **74**, *7, 261-267*.

Carlson, J. G. — 1952 — Microdissection studies of the dividing neuroblast of the grasshopper Chortophaga viridi-fasciata. — *Chromosoma* **5**, *199-220*.

Carlson, J. G. — 1956 — On the mitotic movements of chromosomes. — *Science*, **124**, *203*.

Chambers, R. — 1924 — The physical structure of Protoplasm as determined by microdissection and injection. — *General Cytology ed. by. E. V. Cowdry, Chicago, 237-309*.

Chambers, R. — 1951 — Micrurgical studies on the kinetic aspects of cell division. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, *1311*.

Clemmons, J. J. and Webster, T. C. — 1953 — An accurate reference system for historadiography and a simplified technique for the determination of the mass of cytoplasmic structures. — *Bioch. Biophys. Acta* **11**, *464-470*.

Cleveland, L. R. 1935 — The Centriole and its role in mitosis as seen in living cells. — *Science* **81**, *598*.

Cleveladd, L. R. — 1938 — Origin and development of the achromatic figure. — *Biol. Bull.* **74**, *41-45*.

Cleveland, L. R. — 1955 — Hormone-induced sexual cycles of Flagellates. XIII. Unusual Behavior of gametes and centrioles of Barbulanympha. — *J. Morph.* **79**, *511*.

Cleveland, L. R. — 1958 — A factual analysis of chromosomal movement in Barbulanympha. — *J. Protozool.* **5**, *47*.

Combee, B. et Recourt, A. — 1958 — Un appareil simple de microradiographie par contact sous des tensions de 1,5 à 5 KV. — *Revue technique Philips, T. XIX*, **9**, *278-291*.

Cornmann, J. — 1944 — A summary of evidence in favour of the traction fiber in mitosis. — *Amer. Nat.* **78**, *410-422*.

Dahl, A. O., Rowley, J. R., Stein, O. L. and Wegstedt, L. — 1956 — The intracellular distribution of mass during ontogeny of pollen in Tradescantia L.. — *Exp. Cell. Res.* **13**, *31-46*.

Dangeard, P. — 1947 — Cytologie végétale et Cytologie générale. — *Ed. Lechevalier, Paris*.

Darlington, C. D. — 1937 — Recent advances in Cytology. — *2nd. Ed. London*.

Davies, H. G. — 1952 — The ultra-violet absorption of living chick fibroblasts during mitosis. — *Exp. Cell. Res.* **3**, *453-461*.

DAVIES, H. G. ENGSTRÖM, A. and LINDSTRÖM, B. O. — 1953 — A comparison between the X-ray Absorption and Optical interference methods for the Mass determination of biological structures. — *Nature,* **172,** *1041.*

DAVIES, M. and SMITH — 1956 — The irradiation of individual parts of single cells in tissue culture with a microbeam of particles. — *Exp. Cell. Res.* **12,** *15-34.*

DE HARVEN, E. et BERNHARD, W. — 1956 — Etude au microscope électronique de l'ultrastructure du centriole chez les Vertébrés. — *Zeitsch. Zellf. u. Mikrosk. Anat.* **45,** *378-398.*

DEVISE, R. — 1922 — La figure achromatique et la plaque cellulaire dans les microsporocytes de Larix europaea. — *Cellule* **32,** *249-312.*

DIETRICH, J. — 1960 — Observation sur le fuseau, au cours de la méiose dans Listera ovata, au moyen de la microradiographie. — *Experientia XVI,* **3,** *108.*

DIETRICH, J. — 1960 — Application de la microradiographie par contact à l'étude de la cellule végétale. — X-Ray Microscopy and X-Ray Microanalysis, Elsevier. — *Proceedings of the 2d Int. Symposium Stockholm, 306-310.*

DIETRICH, J. et GAGNIEU, A. — 1960— Structures orientées mises en évidence par microradiographie, au cours de caryocinèses dans les cellules végétales. — *C. R. Ac. Sc.,* **251,** *2761-2763.*

DIETZ, R. — 1956 — Die Spermatocytenteilungen der Tipuliden. II. Mitteilung. Graphische Analyse der Chromosomenbewegung während der Prometaphase I. — *Chromosoma* **8,** *183-211.*

DEYSSON, G. — 1956 — Les facteurs de la mito-inhibition végétale. — «Les facteurs de la croissance cellulaire», *Masson, Paris.*

DEYSSON, G. — 1961 — Les degrés de l'inhibition mitotique partielle dans la cellule végétale. — *Pathologie et Biologie* **9,** *500.*

DURYEE, W. R. and DOHERTY, J. K. — 1954 — Nuclear and cytoplasmic organoids in the living cell. — *Am. N. Y. Ac. Sci.* **58,** *1210-1231.*

ELLENHORN, J. — 1933 — Experimental photographische Studien der ruhenden Zelle. — *Z. Zellf. u. mikr. Anat.* **20,** *288.*

ENGSTRÖM, A. and LINDSTRÖM, B. O. — 1950 — A Method for the determination of the mass of extremely small biological objects. — *Biochim. et Biophys. Acta* **4,** *351-373.*

FAGERLIND, F. — 1958 — Changes in construction and position of chromosomes during the different phases of mitosis and meiosis. — *Hereditas* **44,** *495-515.*

FLEMMING, W. — 1879 — Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. — *Arch. f. mikr. Anat. Bd.* **16,**

GALINSKY, I. — 1949 — The effects of certain phosphates on mitosis in Allium roots. — *J. Heredity* **44,** *23-29.*

GAY, H. — 1956 — Nucleocytoplasmic Relations in Drosophila. — *Symposia Quant. Biol. Cold, Spring Harbor* **21,** *257-267.*

GEITLER, L. — 1943 — Die Mechanik der Mitose. — *Naturwiss.* **31,** *501.*

GEITLER, L. — 1938 — Chromosomenbau. — *Protoplasma-monographien,* **14,** *Berlin.*

GOLDSTEIN, L. and MICOU, J. — 1959 — On the primary site of nuclear RNA synthesis. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6,** *301.*

GOTTSCHALK, W. — 1954 — Die Ausbildung der Phragmoplasten während des Ablaufs der Meiosis. — *Naturwiss.* **41,** *307.*

GREULICH, R. G. and ENGSTRÖM, A. — 1956 — A new approach to high resolution microradiography using extremely soft X-Ray. — *Exp. Cell. Res.* **10,** *251.*

HARVEY, E. B. — 1936 — Parthenogenetic merogamy or cleavage without nuclei in Arbacia punctata. — *Biol. Bull.* **71,** *101-122.*

Harvey, E. B. — 1960 — Cleavage with nucleus intact in sea urchin eggs. — *Biol. Bull.* **119**, *87.*

Heilbrunn, L. V. — 1956 — The dynamics of living protoplasm. — *Academic Press, New-York.*

Hiramoto, Y. — 1956 — Cell division without mitotic apparatus in sea urchin eggs. — *Exp. Cell. Res.* **11**, *630-636.*

Hoffmann-Berling, H. — 1954 — Die Bedeutung der Adenosintriphosphate für die Zell- und Kernteilungsbewegungen in der Anaphase. — *Bioch. et Biophys. Acta* **15**, *226-236.*

Hoffmann-Berling, H. — 1954 — Die Glycerin-Wasser extrahierte Telophasenzelle als Modell der Zytokinese. — *Biochim. et Biophys. Acta* **15**, *332-339.*

Hoffmann-Berling, H. — 1959 — dans "Cell Organism and Milieu". — *Ronald Press N. Y., Rudnick, éd.*

Hughes, A. F. — 1952 — The mitotic Cycle. — *Academic Press N. Y.*

Hughes, A. F. and Swann, N. M. — 1948 — Anaphase movement in living cell. A study with phase contrast and polarized light on chick tissues culture. — *J. Exp. Biol.* **25**, *45-70.*

Hughes-Schrader, S. — 1943 — Polarization, Kinetochore movements and bivalent structure in meiosis of male mantids. — *Biol. Bull.* **85**, *265-300.*

Hughes-Schrader, S. — 1947 — The pre-metaphase strech and kinetochore orientation in phasmids. — *Chromosoma* **3**, *1-21.*

Hughes-Schrader, S. and Schrader, F. — 1961 — The kinetochore of the Hemiptere. — *Chromosoma* **12**, *327-350.*

Inoue, S. — 1952 — The effect of Colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. — *Exp. Cell. Res.* **2**, *suppl. 2, 305-318.*

Inoue, S. — 1953 — Polarization optical studies of the mitotic spindle. I. The demonstration of spindle fibers in living cells. — *Chromosoma* **5**, *787.*

Inoue, S. — 1960 — On the physical properties of the mitotic spindle. — *Ann. N. Y. Ac. Sci.* **90**. *529.*

Inoue, S. and Bajer, A. — 1961 — Birefringence in endosperm mitosis. — *Chromosoma* **12**, *48-63.*

Ito, S. — 1960 — The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells of Drosophila virilis. — *J. Biochem. Biophys. Cytol* **7**, *433-442.*

Izutsu, K. — 1958 — Phase contrast cinematographic studies on Meiosis in Orthopteran spermatocytes. — *Cytologia,* **23**, *485-495.*

Izutsu, K. — 1960 — Phase contrast cinetographic studies on movement in the first meiotic anaphase. — *Cytologia* **25**, *293-304.*

Jacobson, W. and Webb, M. — 1952 — The two types of nucleoproteins during mitosis. *Exp. Cell. Res.* **3**, *163-183.*

Jungers, V. — 1931 — Figures caryocinétiques et cloisonnement du protoplasme dans l'endosperme d'Iris. — *La Cellule* **40**, *291-374.*

Jungers, V. — 1934 — Mitochondries, chromosomes et fuseau dans les sporocytes d'Equisetum limosum. — *La Cellule* **43**, *331-340.*

Kaufmann, B. P., McDonald, M. and Gay, H. — 1948 — Enzymatic degradation of Ribonucleoproteins of Chromosomes, Nucleolus and Cytoplasm. — *Nature* **162**, *814.*

Kaufmann, B. P. and Das, N. K. — 1954 — The role of ribonucleoproteins in the production of mitotic abnormalities. — *Chromosoma* **7**, *19-38.*

Kawamura, K. — 1955 — The cause of spindle formation in the spermatocytes of the grasshopper Acrydium japonicus observed by phase microscopy. — *Cytologia* **20**, *47-51.*

KAWAMURA, K. — 1957 — Studies on mitotic apparatus an Cytokinesis of spermatocytes of nine species of grasshopper. — *Cytologia* **22**, *337-346.*

KAWAMURA, K. — 1960 — Studies on cytokinesis in neuroblastes of the grasshopper Chortophaga viridifasciata.
I. - Formation and behavior of the mitotic apparatus. — *Exp. Cell. Res.* **21**, *1.*
II. - The role of the mitotic apparatus in cytokinesis. — *Exp. Cell. Res.* **21**, *9.*

KAWAMURA, K. and CARLSON, J. G. — 1962 — Studies on cytokinesis in neuroblasts of the grasshopper Chortophaga viridifasciata (de Geer). III. Factors determining the behaviour of the cleavage furrow. — *Exp. Cell. Res.* **26**, *411-423.*

KOOPMANS, A. — 1958 — Die Persistenz der Chromosomenspindelfaser. — *Naturwiss.* **3**, *66-67.*

KOSTOFF, D. — 1938 — A contribution to the chromosome structure and behaviour. — *La Cellule* **47**, *217-227.*

KUWADA, V. — 1929 — Chromosome arrangement. I. Model Experiments with Floating magnets and some theoretical considerations on the Problem. — *Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ.* **4**, *199.*

LACOUR, L. F. and CHAYEN, J. — 1958 — A cyclic staining behaviour of the chromosomes during Mitosis and Meiosis. — *Exp. Cell. Res.* **14**, *462.*

LA FONTAINE, J. G. - 1958 — Structure and Mode of formation of the Nucleolus in Meristematic Cell of Vicia faba and Allium cepa. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, *777-784.*

LEPPER, R. — 1956 — The plant centrosome and the centrosome-blepharoplast homology. — *Bot. Rev.* **22**, *375-417.*

LETTRE, R. und SIEBS, W. — 1954 — Zur Srtuktur des Nucleolus. — *Naturwiss.* **41**, *458.*

LEVAN, A. — The effect of Colchicine on root-mitoses in Allium. — *Hereditas* **24**, *471-486.*

LIMA DE FARIA, A. — 1956 — The role of the Kinetochore in chromosome organization. — *Hereditas* **42**, *85-160.*

LIMA DE FARIA, A. — 1958 — Recent advances in the study of the kinetochore. — *Int. Rev. Cytol.* **7**, *123-157.*

LINDSTRÖM, B. — 1955 — Roentgen Absorption Spectrophotometry in Quantitative Cyto Chemistry. — *Acta Radiol. Scand., Suppl.* **125**, *Stockholm.*

LINDSTRÖM, B. — 1960 — An evaluation quantitative microradiographic procedures applied to biological and medical research. — *Proc. 2d intern. Symposium, Stockholm, 288-289.*

LONGWELL, A. et MOTA, M. — 1960 — Distribution des matériaux cellulaires au cours de la méiose. — *Endeavour* **19**, *74, 100.*

MAKINO, S. and NAKAHARA — 1954 — Behavior of the mitochondria in relation to the division of the anuclear cytoplasmic Bud in Grasshopper spermatocytes. — *Chromosoma* **7**, *14-18.*

MAKINO, S. and NAKANISHI — 1955 — A quantitative Study on anaphase movement of chromosomes in living Grasshopper spermatocytes. — *Chromosoma* **7**, *438-450.*

MANGENOT, C. — 1941 — Substances mitoclasiques et cellules végétales. — *Rev.* de Cytol. et de Cytophys. **5**, *169-264.*

MARSLAND, D. — 1956 — Protoplasmic contractility in relation to gel structure: temperature-pressure experiments on cytokinesis and amoeboid movement. — *Intern. Rev. Cytol.* **5**, *199-227.*

MARSLAND, D. ZIMMERMAN, A. M. and AUCLAIR, W. — 1960 — Cell division: experimental induction of cleavage furrows in the eggs of Arbacia punctulata. — *Exp. Cell. Res.* **21,** *179-196.*

MARTENS, P. — 1927 — Recherches expérimentales sur la cinèse dans la cellule vivante. — *La Cellule,* **38,** *67-174.*

MAZIA, D. — 1955 — The organization of the mitotic apparatus. — *Sympos. Soc. f. Exper. Biol., N° IX, Fibrous proteins and their biological significance, 335-357.*

MAZIA, D. — 1960 — The analysis of cell division. — *Annals. N. Y. Acad. Sci.,* **90,**

MAZIA, D. — 1961 — Mitosis and the Physiology of Cell Division. — dans «*The Cell*», *Vol.* **3,** *77-394.*

METZ, C. W. — 1936 — Factors influencing chromosome movements in Mitosis. — *Cytologia* **7,** *219.*

METZ, C. W. — 1933 — Monocentric mitosis with segregation of chromosomes and its baering on the mecanism of mitosis. — *Biol. Bull.* **64,** *333-347.*

MEYER, G. F., HESS O. und BEERMANN, W. — 1961 — Phasenspezifische Funktionsstrukturen in spermatocytenkernen von Drosophila Melanogaster und ihre Abhängigkeit vom Y Chromosom. — *Chromosoma* **12,** *676-716.*

MILOVIDOV, P. — 1949 — Physik und Chemie des Zellkernes. — *Protoplasma Monographien* **20,** *Berlin.*

MITCHISON, J. M. — 1952 — Cell membranes and cell division. — *Symp. Soc. Exp. Biol.* **6,** *105.*

MITCHISON, J. M. and SWANN, MM. — 1953 — Measurements on sea-urchin eggs with an Interference microscope. — *Quart. J. Microscop. Sci.* **94,** *381-389.*

MOTA, M. — 1952 — The action of seed extracts on chromosomes. — *Arch. Pat. (Lisbon.)* **24,** *336.*

NEMEC, B. — 1929 — Über den Einfluss des Nicotins auf sich teilende Zellen. — *Protoplasma* **7,** *99.*

ONG SING POEN — 1959 — Microprojection with X-Rays. — *Delft.*

OESTERGREN, G. — 1945 — Equilibrium of trivalents and the mechanism of chromosome movements. — *Hereditas* **31,** *abstract. 498.*

OESTERGREN, G. — 1950 — Considerations of some elementary features of mitosis. — *Hereditas* **36,** *1-18.*

OESTERGREN, G. — 1950 — Cytological standards for the quantitative estimation of spindle disturbances. — *Hereditas* **36,** *371-382.*

OESTERGREN, G. — 1954 — Astral rays in normal and chemically disturbed mitosis of higher plants. — *VIII Congr. int. Bot. Sec.* **9-10,** *15-16.*

OESTERGREN, G. et BAJER, A. — 1960 — in «L'action antimitotique et caryoclasique de substances chimiques». — (J. Turchini et P. Sentein édit.), *Colloque C.N.R.S.* **88,** *Paris, 199.*

OESTERGREN, G., MOLE-BAJER, J. and BAJER, A. — 1960 — An interpretation of transport phenomena at mitosis. — *Annals. N. Y. Ac. Sci.* **90.** *381-408.*

OESTERGREN, G., KOOPMANS, A. and REITALU, J. — 1953 — «The occurence of the amphiastral type of mitosis in higher plants...». — *Bot. Notiser* **28,** *417-419.*

OTA, T. — 1957 — Division of the generative cell in the Pollen Tube. — *Cytologia* **22,** *15-27.*

OTTOSON, R. and GLICK, D. — 1959 — Studies in Histochemistry. I. Measurement of water in histological structures by a direct microradiographic Method. — *Exp. Cell. Res.,* **16.** *88-97.*

PATTEE, H. H. — 1960 — High resolution radiosensitive materials for microradiography at long wavelengths. — *X-Ray Microscopy and X-Ray Microanalysis Elsevier, Proc. 2d intern. Symposium, Stockholm, 61-65.*

Pearse Everson, A. G. — 1961 — *Histochemistry: theorical and applied.* — *2d ed., London.*

Pease, D. C. — 1946 — Hydrostatic pressure effects upon the spindle figure and chromosome movements. II. Experiments on the meiotic division of Tradescantia. — *Biol. Bull.* **90-91**, *145-169.*

Pelling, G. — 1959 — Chromosomal synthesis of Ribonucleic Acid as shown by Incorporation of Uridine labelled with Tritium. — *Nature* **184**, *656.*

Pfeiffer, H. H. — 1938 — Experimentale Beiträge zur Mitosephysik. — *Arch. exp. Zellforsch.* **22**, *263-267.*

Piza, S. — 1943 — The Uselessness of the spindle fibers for moving the chromosomes. — *Amer. Naturalist.* **77**, *442-462.*

Policard, A. et Baud, C. A. — 1958 — Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus. — *Masson, éd., Paris.*

Policard, A. et Bessis, M. — 1955 — Etude au microscope électronique de la centrosphère des leucocytes des Mammifères. — *Exp. Cell. Res.* **8**, *583-585.*

Politzer, G. — 1934 — Pathologie der Mitose, *Protoplasma Monographien*, **7**, *Berlin.*

Porter, K. R. — 1961 — The Ground substance; Observations from Electron Microscopy. — *The Cell* **2**, *621-675.*

Porter, K. R. and Machado, R. D. — 1960 — Studies on the Endoplasmic Reticulum IV. Its Form and Distribution during Mitosis in Cells of Onion Root tip. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, *167.*

Prescott, D. M. and Bender, M. A. — 1962 — Synthesis of RNA and protein during mitosis in Mammalian tissue culture cells. — *Exp. Cell. Res.* **26**, *260-268.*

Reiss, P. — 1947 — Interprétation physico-chimique du mécanisme de la Mitose. — *Actualités scientifiques et industrielles, 1033, 1-39, Hermann, éd., Paris.*

Reitberger, A. und Büchner, E. — 1958 — Zur Karyologie der Meiose des Lebermooses Sphaerocarpus Donnellii. — *Chromosoma* **9**, *258-268.*

Rhoades, M. M. and Vilkomerson, H. — 1942 — On the anaphase movement of chromosomes. — *Proc. Nat. Acad. Sci.* **28**, *433-436.*

Richards, B. M. and Bajer, A. — 1961 — Mitosis in Endosperm changes in nuclear and chromosome mass during Mitosis. — *Exp. Cell. Res.* **22**, *503.*

Ris, H. — 1943 — A quantitative study of Anaphase movement in the aphid Tamalia. — *Biol. Bull.* **85**, *164-178.*

Ris, H. — 1949 — The Anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of the grasshopper. — *Biol. Bull.* **96**, *90-106.*

Ris, H. and Kleinfeld, R. — 1952 — Cytochemical studies on the chromatin elimination in Solenobia (Lepidoptere). — *Chromosoma* **5**, *363.*

Roberts, H. S. and Johnson, N. S. — 1956 — Cytokinesis of multispindle cells. — *Biol. Bull.* **110**, *334-343.*

Robyns, W. — 1924 — Le fuseau de caryocinèse et le fuseau de cytocinèse dans les divisions somatiques des Phanérogames. — *La Cellule* **34**, *367-454.*

Robyns, W. — 1929 — La figure achromatique sur matériel frais dans les divisions somatiques des Phanérogames. — *La Cellule* **39**, *83-121.*

Rosza, G. and Wykoff, R. — The electron microscopy of dividing Cell. — *Biochem. Biophys. Acta* **6**, *334.*

Rustad, R. C. — 1959 — An interference microscopical and cytochemical analysis of local mass changes in the mitotic apparatus during mitosis. — *Exp. Cell. Res.* **16**, *575.*

Salmon, J. — 1961 — Perspectives et bilan des techniques microscopiques par rayons X dérivées de la microradiographie en particulier dans le domaine végétal. — *Bull. de Microscopie appliquée* (2), **11**, *n° 2, 17-67.*

Sato, S. — 1958 — Electronic Microscope studies on the mitotic figure. I. Fine structure of the metaphase spindle. — *Cytologia* **23**, *383.*

Sato, S. — 1959 — Electronic Microscope studies on the mitotic figure. II. Phragmoplast and cell plate. — *Cytologia* **24**, *98.*

Sato, S. — 1960 — Electron microscope studies on the mitotic figure. III. Process of the spindle formation. — *Cytologia* **25**, *119-131.*

Schaede, R. — 1929 — Kritische Untersuchungen über die Mechanik der Karyokinese. — *Planta* **8**. *383-397.*

Schaede, R. — 1930 — Zentrifugalversuche mit Kernteilungen. — *Planta* **11**, *243-262.*

Schmidt, W. J. — 1937 — Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. — *Protoplasma Monographien*, **11**, *Berlin.*

Schmidt, W. J. — 1939 — Doppelbrechung der Kernspindel und Zugfasertheorie der Chromosomenbewegung. — *Chromosoma* **1**, *253-264.*

Schneider, B. — 1933 — Über Unordnung der Chromosomen bei der Mitose. — *Z. Zellf. u. mikr. Anat.* **17**, *255.*

Schneider, B. — 1939 — Die Plasmaveränderungen bei der Pflanzenzellteilung. — *Arch. Exper. Zellforsch.* **22**, *298-303.*

Schrader, F. — 1947 — Data contributing to an analysis of Metaphase mechanics. — *Chromosoma* **3**, *22-47.*

Schrader, F. — 1953 — *Mitosis* — 2nd Edit. New York, *Columbia, Univ. Press.*

Scott, A. C. — 1960 — Furrowing in flattend sea urchin eggs. — *Biol. Bull.* **119**, *246-259.*

Sedar, A. W. and Wilson, D. F. — 1051 — Electron microscopic studies on the normal and colchicinized mitotic figures of the Onion root tip (A. cepa). — *Biol. Bull.* **100**, *107-115.*

Selby, C. C. — 1953 — Electron micrographs of mitotic cells of the Ehrlich mouse ascites tumor in thin sections. *Exp. Cell. Res.* **5**, *386-393.*

Selman, G. G. and Waddington, C. H. — 1955 — The mecanism of cell division in the cleavage of the newt's egg. — *J. of. Exp. Biol.* **32**, *700-733.*

Serra, J. A. — 1947 — Composition of Chromonemata and matrix and the role of nucleoproteins in mitosis and meiosis. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, *192-210.*

Sharp, L. W. — 1943 — *Fundamental of Cytology.* — *Mc Graw-Hill,* New York.

Shimamura, T. — 1940 — Studies on the effect of centrifugal force on the cell division. — *Cytologia* **11**, *186-216.*

Shimarura, T. and Ota, T. — 1956 — Cytochemical studies on the mitotic spindle and the phragmoplast of plant cells. — *Exp. Cell. Res.* **11**, *396.*

Shiwago, P. I. et Tuchatcheva — 1939 — Problème de la dynamique des «filaments de traction» dans la mitose. — *Arch. Anat. microscop.* **35**, *457.*

Sirlin, J. L. — 1961 — Le nucléole du noyau cellulaire. — *Endeavour vol. XX*, **79**, *146.*

Sitte, P. — 1961 — Die submikroskopische Organisation der Pflanzenzelle. — *Ber. Deutsch. Bot. Gesell. 64,* **6**, *177-206.*

Stich. H. — 1954 — Stoffe in Strömungen in der Spindel von Cyclops strenuus. Ein Beitrag zur Mechanik der Mitose. — *Chromosoma* **6**. *199.*

Stich, H. and Mc Intyre, J. — 1958 — X-Ray absorption studies on the nuclear protein and RNA content during the development of the mitotic apparatus. — *Exp. Cell. Res.* **14**, *635.*

Swann, M. M. — 1951 — Protoplasmic structure and mitosis. — *Journ. of experiment. Biol.* **28**, *417.*

Swann, M. M. — 1952 — The nucleus in fertilisation mitosis and cell division. — *Symp. Soc. Exp. biol.* **6**, *p. 89.*

Swann, M. M. and Mitchison, J. M. — 1953 — Cleavage of sea-urchin eggs in Colchicine. — *J. Exp. Biol.* **30**, *506-514.*

Swanson, C. P. — 1957 — *Cytology and Cytogenetics. — Prentice-Hall, New York.*

Tandler, C. J. — 1959 — The silver-reducing property of the Nucleolus and the formation of perinucleolar material during Mitosis. — *Exp. Cell. Res.* **17**, *560-564.*

Taylor, E. W. — 1959 — Dynamics of spindle formation and its inhibition by chemicals. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, *193.*

Taylor, E. W. — 1960 — Dynamics of spindle formation. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **90**,

Uber, F. M. and Goodspeed, T. H. — 1935 — Microincineration Studies. I. Localization of inorganic elements in Plant cell Walls. — *Proc. Nat. Acad. Sc., vol.* **21**, *428-433.*

Uber, F. M. and Goodspeed, T. H. — 1936 — Microincineration Studies. II. Localization of ash-yielding substances during meiosis and its possible significance in X-Irradiation phenomena. — *Bot. Gaz.* **97**, *416-420.*

Wada, B. — 1935 — Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. II. Das Verhalten der Spindelfigur und einige ihrer physikalischen Eigenschaften in den somatischen Zellen. — *Cytologia* **6**, *381-406.*

Wada, B. — 1950 — The mechanism of mitosis based on studies of the submicroscopic structure of the living state of the Tradescantia Cell. — *Cytologia* **16**, *1-26.*

Wada, B. and Fukunaga, K. — 1957 — A new technique to demonstrate the surface membrane of the spindle in Preparations. — *Cytologia,* **22**, *p. 442-451.*

Wassermann, F. — 1929 — Die lebendige Masse. — Möllendorffs *Handbuch der mikroskopischen Anatomie,* Bd 1/2, 1929, *Berlin.*

Wassermann, F. — 1939 — Mechanismus der Mitose. — *Arch. Exp. Zellf.* **22**. *238-257.*

Wolpert, L. — 1960 — The mechanics and mechanism of cleavage. — *Intern. Rev. of Cytol.* **10**, *163-216.*

Zirkle, C. — 1931 — Nucleoli of the root tip and Cambium of Pinus strobus. — *Cytologia* **2**, *85-104.*

Zirkle, R. E. — 1956 — Cellular aspects of basic Mechanismus in Radiobiology. — Nuclear Science Series, Report n° 8, *Publ. 450,* **1**, *Research Concil., Washington D. C.*

Zirkle, R. E. — 1957 — Partial - Cell irradiation. — *Adv. Biol. Med. Phys. U. S. A.,* **5**, *103-146.*

Zirkle, R. E., Uretz, R. B. and Haynes, R. H. — 1960 — Disappearence of spindles and phragmoplastes after microbeam U. V. irradiation of cytoplasm. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **90**,

Documentation cytologique générale.

«*Traité de Cytologie végétale*» par A. Guilliermond, G. Mangenot et L. Plantefol. — *Libr. E. Le François, Paris, 1933.*

«*X-Ray Microscopy and Microanalysis*». Edit. by Engström, V. E. Cosslett and H. H. Pattee. — *Elsevier Publ. Company, Amsterdam, Lonodon, New York, Princeton, 1960.*

«*The Cell*» (Biochemistry, Physiology, Morphology). — Edit. by J. Brachet and A. E. Mirsky. — *Academic Press, New York et London, vol. I, II, III, 1959-1961.*

«*International Review of Cytology*». Edit. G. H. Bourne and J. F. Danielli. — *Academic Press, New York and London. 1961-62,* **10,** 1960 (Index Vol. 1-9), **11, 12, 13,** 1961-192.

Propositions données par la Faculté
ou éventuellement, seconde Thèse:

LA MEMBRANE CELLULOSIQUE DES VEGETAUX,
SON ETUDE PAR LES METHODES PHYSIQUES.

Strasbourg, le 14 mars 1963
Le Président de Thèse,
M. MARESQUELLE.

Vu,
Strasbourg, le 14 mars 1963
Le Doyen,
G. MILLOT.

Vu et permis d'imprimer:
Strasbourg, le 16 mars 1963
Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université:
J.-P. ANGELLOZ.

Imprimerie Sutter Woerth - Dép. légal 1er trim. 1963 - Imp. No 562